

TESIS DOCTORAL

Aplicación de la electroforesis
bidimensional en diferentes especies:
Vibrio tapetis, *Pseudoscleropodium*
purum y *Mus musculus*

José Bermúdez Crespo

Santiago de Compostela, 2014





El Prof. Dr. GONZALO ÁLVAREZ JURADO, Catedrático del Departamento de Genética de la Facultad de Biología en la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado "*APLICACIÓN DE LA ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN DIFERENTES ESPECIES: VIBRIO TAPETIS, PSEUDOSCLEROPODIUM PURUM Y MUS MUSCULUS*", ha sido realizado bajo su tutoría por el licenciado en Biología D. José Bermúdez Crespo, y lo autoriza a ser presentado como trabajo de Tesis Doctoral ante el tribunal correspondiente en la Universidad de Santiago de Compostela.

Santiago de Compostela, febrero de 2014

Prof. Dr. Gonzalo Álvarez Jurado





UNIVERSIDAD DE JAÉN
Departamento de Biología Experimental

El Prof. Dra. Amelia Aránega Jiménez, Profesora Titular del Departamento de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Experimentales en la Universidad de Jaén,

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado "*APLICACIÓN DE LA ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN DIFERENTES ESPECIES: VIBRIO TAPETIS, PSEUDOSCLEROPodium PURUM Y MUS MUSCULUS*", ha sido realizado bajo su tutoría por el licenciado en Biología D. José Bermúdez Crespo, y lo autoriza a ser presentado como trabajo de Tesis Doctoral ante el tribunal correspondiente en la Universidad de Santiago de Compostela.

Jaén, 27 de febrero de 2014

Prof. Dra. Amelia Aránega



A José Luis





ÍNDICE

Agradecimientos	11
INTRODUCCIÓN	15
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	17
2. GENÓMICA <i>VERSUS</i> PROTEÓMICA.....	19
3. METODOLOGÍA PROTEÓMICA	23
3.1. Electroforesis bidimensional de alta resolución (2-De).....	24
3.2. Espectrometría De Masas.....	27
3.3. Cromatografía Multidimensional	29
4. APLICACIONES PROTEÓMICAS.....	31
OBJETIVOS.....	35
CAPÍTULO 1	39
CAPÍTULO 2	75
CAPÍTULO 3	89
CAPÍTULO 4	101
DISCUSIÓN	115
CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	131





AGRADECIMIENTOS



Agradecimientos

Por fin ha llegado el momento de agradecer a todas las personas que me han apoyado y me han dado su aliento durante toda esta travesía que es la realización de una Tesis Doctora. La verdad que he tardado más de lo que debería, soy muy consciente de ello, pero parece que por fin esta etapa ha llegado a su final.

Lo primero que quiero es agradecer a mis directores su labor y su apoyo. A Gonzalo agradecerle que haya actuado como lo que yo creo que es un director impecable, dejándome mi espacio y permitiendo que escribiese la tesis con mi estilo, pero siempre ha estado pendiente, corrigiéndome y apoyándome cuando era necesario. Sobre Amelia sólo tengo palabras de admiración, aún recuerdo el primer día que llegué a Jaén para quedarme unos cuantos meses, como me acogió con los brazos abiertos, y siempre tuvo tiempo y ganas para trabajar conmigo. Mi aprecio hacia ella sobrepasa lo estrictamente laboral y forma parte de lo que yo denomino mi “Familia Andaluza”.

También quiero agradecer los buenos momentos vividos a todas las personas con las que he compartido mis vivencias en el Departamento de Genética: Carlos Zapata, María López, Paco, Jaime, Ana, los chicos de Ana, y todos los estudiantes pre-doctorales que de alguna u otra forma me han enriquecido con su compañía.

Durante estos años he colaborado con varios grupos de investigación, ayudando y aprendiendo de todos ellos. Fran, Jana, Andrés, Isaac, Ángel García, los “seminaristas” de los viernes en el hospital, que buenos e interesantes momentos pasamos debatiendo sobre la EttanSix, las condiciones del IEF, los diferentes tipos de tinción etc... Yo la verdad que me lo he pasado bomba.

Ha sido un placer trabajar al lado de Jesús Romalde y Sabela Balboa, me hicieron sentir un miembro más de su departamento. Su ayuda y cercanía me hecho sentir muy a gusto. Nos han quedado varios estudios interesantes por realizar que espero que en algún momento los puedan llevar a cabo.

Exactamente lo mismo puedo decir de mis compañeros del departamento de Ecología, Alejo, Teresa, Ángel y Jesús. Ha sido un placer trabajar a vuestro lado, los consejos, las facilidades y libertad que me habéis dado, la comprensión que habéis tenido con los retrasos son dignas de alabar. Y a ti Jesús..... que sería de esta tesis sin tu ayuda, sin tu aliento, sin tus ánimos, aunque ya te lo dije en persona, quiero hacerlo público, te considero el padrino de mi etapa en el doctorando, y si pudiese te nombraría padrino de esta Tesis.

Durante mi etapa de doctorado viví una experiencia que me marcó, y me acompañara durante toda mi vida. Esta experiencia fue pasar casi un año en Jaén, la tierra del olivo. Allí conocí lo que es estar inmerso en un grupo de investigación puntero, allí conocí la salsa de la vida, la exigencia con cariño. Crecí como persona, y de ello tienen la culpa todas las personas que conocí: Amelia, Diego, Jorge, Paquito, Alberto, Houria, Estefanía, Ana, María Luisa, Paco Navarro, Carud y un largo etc... En especial quiero agradecer los tiempos vividos, y que hoy se siguen produciendo a pesar de la distancia, a mis tres hermanitos andaluces: Mamen, Jaime y Angelito. Conocerlos a vosotros ha sido lo mejor que me ha pasado en la tierra del olivo. Puedo decir que os quiero!!

Toca la hora de agradecer a esas personas que conoces de casualidad, casi por que te toca, porque están allí.... Y se acaban convirtiendo en personas importantes en tu vida: Me refiero a esos pedazo de Cracks que han llenado mi vida durante todos estos años:, Ampe, Rosi, Esther, Ana Eco, Cris y Óscar. Sois lo mejor que me ha pasado en mi etapa de la universidad, y seguiremos juntos, aunque en la distancia, por mucho, mucho tiempo.

Quiero destacar y agradecer mucho el apoyo recibido de mi familia, mis padres y mi hermana, sin su apoyo, seguramente que hubiese dejado la tesis a medias. Así que si estoy escribiendo estos agradecimientos, eso se lo debo a ellos. Gracias por vuestro apoyo Family !!!

Y por último, quiero dedicarle esta tesis, a la persona que más ha influido en mi visión de la investigación como algo divertido y pasional. Le dedico esta Tesis a José Luis. El fue el que me introdujo en el maravilloso mundo de la electroforesis bidimensional. De ti aprendí a ser un optimista incorregible, tener el afán de beberme cada minuto de vida. Fuiste mucho más que un director, fuiste un amigo y hermano mayor. Fui muy feliz a tu lado, Jefe. Te querré siempre.



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El término “proteoma” fue acuñado por Marc Wilkins en 1994, para describir el conjunto de PROTeínas que están codificadas por un genOMA. De forma imperceptible, la palabra proteoma dio lugar a una nueva disciplina “la Proteómica”. La proteómica podría definirse como el conjunto de métodos que se usan para el análisis sistemático de las proteínas. Aunque por este hecho, podría parecer que el estudio del proteoma es más bien reciente, realmente el estudio de las proteínas a gran escala puede remontarse varias décadas atrás. Todo comenzó cuando Patrik O’Farrell, en 1975, desarrolla una técnica que permitía separar las proteínas según dos parámetros independientes, la cual se convertiría, más adelante, en la técnica central del estudio proteómico. Nacía en ese momento la electroforesis bidimensional de alta resolución (2-DE) (O’Farrell, 1975).

En la década de los ochenta, se desarrollaron mejoras que permitieron un manejo más fácil y más rápido de la técnica mejorando así su reproducibilidad, lo que permitió la comparación de resultados entre laboratorios (Bjellqvist *et al.*, 1982). Gracias a estos avances, se empezaba a pensar en las grandes posibilidades que esta técnica podría otorgar a la comunidad científica. En la década de los noventa, surgió un importante avance comparable al desarrollo de la electroforesis bidimensional, se logró la ionización suave de las proteínas sin llegar a romperlas. Este hecho conllevó al desarrollo de la Espectrometría de Masas, que surge como un método analítico muy poderoso, ya que elimina la mayoría de las limitaciones del análisis de identificación de las proteínas (Hamdan & Righetti, 2005).

Hasta hace poco, nos encontrábamos ante la “gran explosión” de la proteómica. En este tiempo se desarrollaron nuevas estrategias y técnicas para el estudio sistemático de las proteínas. Cada año se mejoraba, lo que existía anteriormente y se desarrollaban nuevos métodos de análisis (Figura 1). Gracias a toda esta revolución, la proteómica ha pasado de describir únicamente la abundancia de las proteínas contenidas en las células a intentar identificar las posibles isoformas, las modificaciones post-traduccionales de las proteínas, las interacciones entre ellas, su descripción estructural y los complejos que forman por asociación.

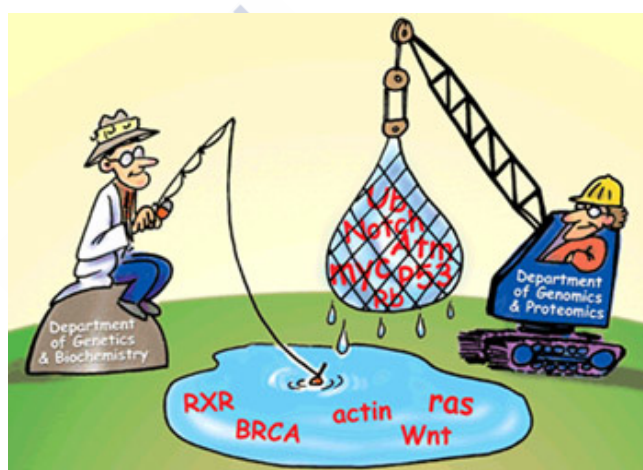


Fig.1 Viñeta ilustrativa para comparar los análisis con un enfoque clásico y uno global (genómico-proteómico).

Después de que se definiera el término proteoma, se han hecho puntualizaciones más precisas quedando definido éste como: un conjunto de proteínas que se expresan en un compartimento celular dado (sea célula, tejido, órgano o fluidos corporales) en un momento determinado, bajo unas condiciones particulares. Esto es debido a que el proteoma, a diferencia del genoma, es un elemento altamente dinámico (Figura 2). La expresión proteica varía como consecuencia de factores ambientales, estado fisiológico, del desarrollo, situaciones de estrés, efectores o señales bioquímicas etc... La activación o supresión de genes, las modificaciones post-transcripcionales entre otros factores, incrementan enormemente la complejidad del proteoma. Así, es necesario hablar de proteoma de

expresión. De esta forma, a partir de un único genoma se pueden expresar multitud de proteomas (Figura 2).

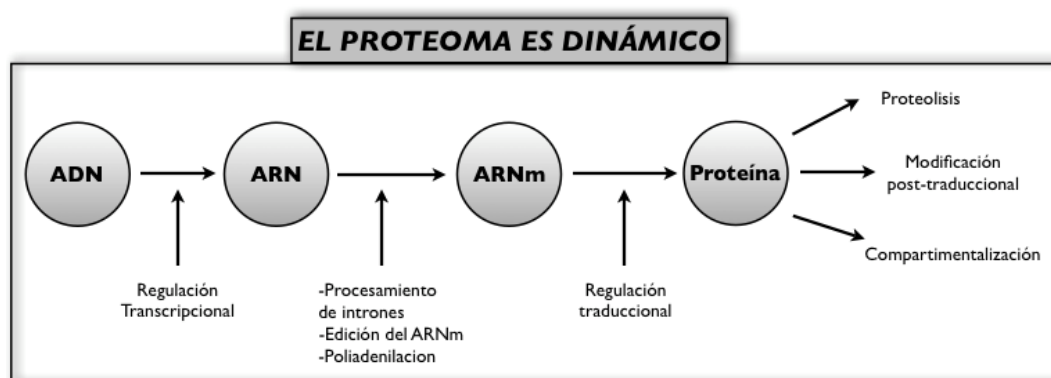


Fig. 2 Mecanismos por los que un gen puede dar lugar a múltiples productos genéticos.

2. GENÓMICA VERSUS PROTEÓMICA

El campo de la genómica engloba muchas tecnologías diferentes. Todas ellas están relacionadas de alguna manera con la información contenida en las células, en otras palabras, su ADN. Los estudios de genética de expresión pueden abordarse mediante estrategias genómicas (basadas en los ácidos nucleicos) o mediante estrategias proteómicas (basadas en las proteínas). La genómica ha entrado en el estudio de su fase funcional gracias al desarrollo de diversas tecnologías como los *microarrays* y las sondas de genes, tecnologías que pueden utilizarse para detectar la actividad genética gracias al estudio del ARNm (Debouck *et al.*, 1999). Sin embargo, estos datos ofrecen una visión limitada cuando se intenta comprender de una forma global los procesos celulares como el desarrollo, la fisiología o las enfermedades. En la genómica, la función del gen es inferida más que demostrada, debido a que la genómica se concentra en estudiar los genes, los “vehículos” que portan la información, en lugar de estudiar el producto final, las proteínas (Bermúdez-Crespo & López, 2007a). Para muchos investigadores, el genoma se puede considerar como un mapa o un plano del organismo, realmente estas dos definiciones hacen pensar en un sistema estático, con imposibilidad de cambios. Una mejor definición que sugiere un sistema dinámico sería definir el genoma como una receta, en la que según se vayan

realizando pequeños cambios en la forma de elaborar el plato, el resultado final puede ser completamente diferente al esperado. La regulación de la expresión génica sería la encargada de añadir o eliminar ingredientes o modificar las cantidades de cada alimento de la receta, dando lugar a un producto acabado diferente cada vez que algún paso de la elaboración de la receta se modifica. Pues lo mismo pasa con la expresión de los genes donde la regulación transcripcional, el procesamiento de intrones, la regulación traduccional y post-traduccional introducen variables que modifican el producto final del proceso, las proteínas.

El genoma es un ente de una complejidad abrumadora, y todavía estamos comenzando a entender tal complejidad. ¿Qué papel ejercen las secuencias no codificantes?, ¿Y, las secuencias repetitivas?. Por otro lado, se ha empezado a comprender que los genomas de las diferentes clases de seres vivos tiene una organización diferente. Así, el genoma de plantas, anfibios y reptiles tiene un número muy superior de genes que los mamíferos. ¿A qué se debe esto?, ¿No deberían ser, entonces, organismos “superiores” a los mamíferos?. La respuesta a estas preguntas reside en la complejidad del genoma y no en el número de genes. Por lo que se conoce hasta ahora, los seres vivos con un número muy elevado de genes, han optado por un estrategia de organización del genoma de duplicación de genes, mientras que los mamíferos optaron por introducir elementos reguladores complejos en su genoma, como la reorganización del ADN, metilación, condensación/descondensación de la cromatina y un largo etcétera de mecanismos reguladores.

Debido a esta elevada complejidad en la regulación de la expresión génica, los investigadores centraron su atención en el estudio del ARNm, abriéndose un vasto campo sobre el estudio de que ARNm estaban presentes en una célula, tejido u organismo en un momento dado. Los investigadores no tardaron mucho tiempo en darse cuenta que el estudio del ARNm de forma aislada solo proporcionaba una visión limitada de la expresión génica ya que no tenía en cuenta los procesos reguladores que se producían en las etapas post-traduccionales como la edición del ARNm y su traducción a proteína (Agaton *et al.*, 2004). Además, otros procesos paralelos como la regulación por el ARN de interferencia (ARNi) o la vida media del ARN añaden todavía más complejidad al estudio del ARNm.

Por otra parte se ha demostrado que existe una baja correlación entre la cantidad de ARNm y la cantidad de la proteína que este ARN codifica. Así, se demostró que para los mismo niveles de ARNm de dos proteínas diferentes, las diferencias en cantidad de proteína entre estas dos proteínas podían llegar a ser de 30 veces, y viceversa, cantidades similares de dos proteínas diferentes divergían en más de 30 veces en su cantidad de ARNm (Anderson & Seilhamer, 1997; Gygi *et al.*, 1999). Si además de esto, se introducen también los procesos de modificación post-traducciona l de las proteínas, la escisión de péptidos y las modificaciones covalentes es fácil entender que la aproximación a nivel de estudio del ARNm no sea válida si se pretende estudiar los procesos celulares de forma global. Por último cabe destacar la relevancia de la proteólisis y los mecanismos de degradación de las proteínas como importante mecanismo de control de los procesos biológicos mediante la hidrólisis específica de los enlaces peptídicos (López-Otín & Overall, 2002). Las proteasas regulan el destino y la actividad de las proteínas gracias a su capacidad de catalizar reacciones hidrolíticas de forma irreversible. Estas enzimas juegan papeles relevantes en diversas enfermedades como artritis, enfermedades cardiovasculares, desórdenes neurodegenerativos y en el cáncer.

La primera fase del proyecto de secuenciación del genoma humano se presentó en el año 2003 (Collins *et al.*, 2003). Desde entonces, la comunidad científica se ha dado cuenta de que el organismo en términos científicos, es mucho más complejo de lo que indica el análisis del material genético de forma aislada. En estos momentos parece que el número de genes humanos ronda los 30.000 genes (Antonarakis, 2010), pero no existe ningún consenso ni ninguna aproximación sobre el posible número de proteínas. Incluso si se tuviesen en cuenta todas las posibles modificaciones que podrían darse en cada una de las proteínas, no se puede descartar que el número de proteínas individuales podría s estar cercano al infinito. Tampoco se debe olvidar que las proteínas no funcionan individualmente, sino que forman complejos mediante interacciones específicas entre ellas, además el proteoma tiene un comportamiento altamente dinámico ya que varía según las diversas condiciones fisiológicas (estrés, enfer-

medad) o el tipo de célula. Incluso, según el momento dado en el que se encuentra una misma célula, ésta expresará unas u otras proteínas.

Las proteínas son el verdadero motor de las células. El estudio de las proteínas nos abre una nueva visión retrospectiva de cómo entender los procesos celulares ya que, el conocimiento básico de la expresión y función proteica es esencial para conseguir una visión completa de los procesos biológicos.

Por lo tanto podemos decir que la proteómica ejerce un papel importantísimo en el estudio de los factores que influyen en la regulación de la expresión génica y que no están directamente determinados por la secuencia del ADN.

En la figura 3 se representa un esquema de las relaciones que existen entre la genómica y la proteómica.

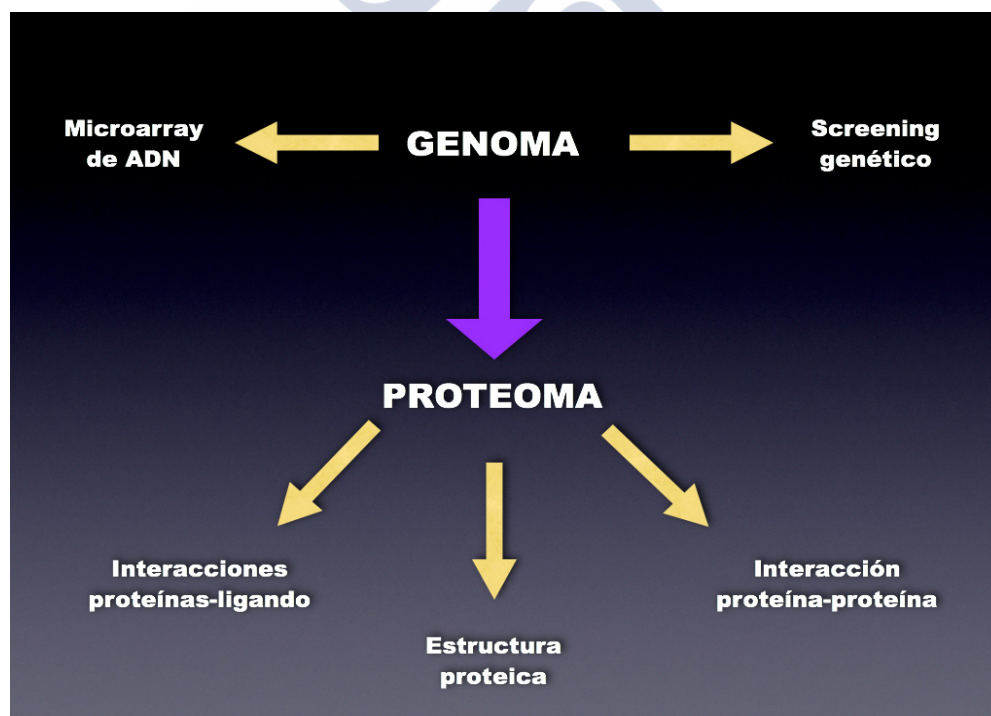


Fig. 3 Esquema sobre la posible integración de un análisis genómico y proteómico.

3. METODOLOGÍA PROTEÓMICA

La metodología proteómica incluye todas aquellas técnicas que se utilizan en el estudio sistemático del proteoma.

A pesar de la inmensa complejidad de los procesos biológicos y de la cantidad de proteínas existentes, la metodología proteómica actual hace posible que se descubran nuevas proteínas asociadas a procesos celulares normales, o proteínas relacionadas con la adaptación de los organismos/células a condiciones fisiológicas/ambientales cambiantes. Así, se han descubierto nuevas proteínas implicadas en el buen funcionamiento de las cascadas de señalización (García, 2006), en la mitosis (Roberts *et al.*, 2006), como también proteínas relacionadas con enfermedades humanas (Bermúdez-Crespo & López., 2007a; Meyer & Stühler., 2007), cambios fisiológicos por adaptación ambiental en plantas (Qureshi *et al.*, 2007) o proteínas de virulencia en microorganismos (Sikora *et al.*, 2011).

El análisis global de proteínas utilizando metodologías proteómicas también tiene sus limitaciones y retos. La principal limitación y reto proviene de todo lo dicho anteriormente, la enorme complejidad del proteoma. La complejidad del proteoma supera con creces la capacidad resolutive de las técnicas proteómicas actuales, requiriéndose métodos de pre-fraccionamiento o sub-fraccionamiento del proteoma para disminuir su complejidad.

Por ejemplo, un organismo unicelular, o un única celular de cualquier tipo celular, contiene proteínas de baja abundancia que pueden estar presentes en menos de 100 copias por célula, mientras que las proteínas más abundantes de esa misma célula pueden alcanzar las cien millones de copias por célula. Esto genera un rango dinámico de 10^6 , pudiendo llegar a 10^{12} en los fluidos corporales como plasma o suero, mientras que las tecnologías proteómicas tiene un rango dinámico de detección que oscila entre 10^3 - 10^4 (Anderson & Anderson, 2002; Corthals *et al.*, 2000).

El paso clave de cualquier análisis proteómico es la selección y preparación de la muestra (Westermeyer & Naven, 2002). Hay que tener en cuenta que

cada tejido ya sea de cualquier especie suele tener una gran heterogeneidad de tipos celulares, lo cual puede ser problemático si el tipo celular de estudio está en baja proporción (Figura 4). Además se debe tener especial cuidado a la hora de preparar la muestras, ya que las proteasas actúan muy rápidamente y pueden comenzar a degradar el tejido parcialmente en poco tiempo.

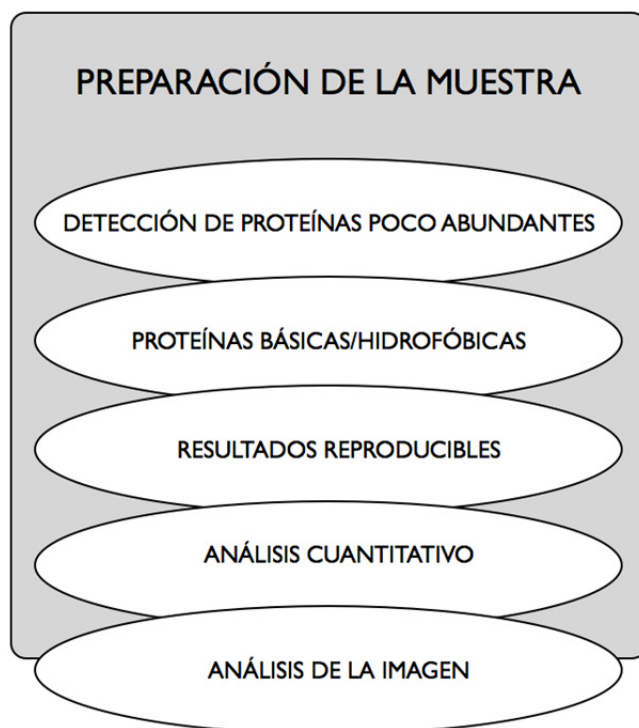


Fig. 4. Representación esquemática de la importancia de una buena preparación de la muestra.

3.1. Electroforesis bidimensional de alta resolución (2-DE)

La tecnología más utilizada para la separación de proteínas es la electroforesis bidimensional de alta resolución en geles de poliacrilamida (2-DE). Fue introducida en la década de los setenta y hasta el momento es la técnica más eficaz y reproducible para resolver mezclas complejas de proteínas.

La electroforesis bidimensional de alta resolución permite separar hasta miles de proteínas en un sólo experimento, y constituye actualmente el método más eficiente para la separación de mezclas muy complejas de proteínas. Esta

técnica fue desarrollada por O'Farrell en 1975 (O'Farrell, 1975). La técnica, resuelve el problema de los geles monodimensionales porque se basa en la separación de las proteínas en función de la carga (primera dimensión), seguida de una separación de las proteínas en función de la masa molecular (segunda dimensión). La separación de la primera dimensión se realiza mediante isoelectroenfoque. En él, las proteínas desnaturalizadas son separadas en un gradiente de pH hasta alcanzar su punto isoeléctrico (pI). Esta etapa, en sus inicios, estaba basada en gradientes de pH preparados con transportadores libres *carrier ampholites*, los cuales creaban un gradiente de pH inestable limitando la reproducibilidad de los geles entre los laboratorios. Por ello, una de las innovaciones clave en isoelectroenfoque fue el desarrollo de geles con gradientes inmovilizados de pH (IPGs) (Bjellqvist *et al.*, 1982). La segunda dimensión es de una separación convencional por tamaño (SDS-PAGE).

Una vez separadas las proteínas es necesario detectarlas o visualizarlas para su posterior análisis. Los métodos para la visualización de las proteínas consisten en una tinción de las mismas con diferentes componentes. Existen varios tipos de tinciones, todos estandarizados. Los métodos más usados para la tinción de las proteínas son: la tinción de plata (Nesterenko *et al.*, 1994), Coomassie –blue (Neuhoff *et al.*, 1988) y compuestos fluorescentes (Patton, 2000).

El aplicar una u otra tinción está normalmente determinado por la posibilidad de una evaluación cuantitativa o semi-cuantitativa de la expresión de las proteínas al comparar dos o más geles, o si basta con una comparación cualitativa entre ellos. Por ejemplo, la tinción de plata no es un método cuantitativo. Su combinación con glutaraldehído hace posible una evaluación semi-cuantitativa, pero el glutaraldehído fija de una manera muy fuerte e irreversible las proteínas al gel. Esta fijación impide una extracción eficiente de las mismas y su posterior digestión por proteasas. Estos impedimentos hacen esta tinción incompatible con cualquier análisis posterior (Shevchenko *et al.*, 1996).

Por el contrario, la tinción con Coomassie es un método cuantitativo y cualitativo, de bajo coste y fácil de usar. Aunque su umbral sensibilidad es menor

que el de la tinción de plata y las glucoproteínas no se tiñen adecuadamente (Goldberg *et al.*, 1988), nos permite usar la espectrometría de masas para la posterior identificación de las proteínas.

Debido a las limitaciones de la tinción de Coomassie, en términos de sensibilidad, y las complicaciones derivadas de la tinción de plata en términos de baja reproducibilidad e incompatibilidad con el método de identificación proteica, se han desarrollado tinciones basadas en compuestos fluorescentes (Patton, 2000). Entre estos métodos cabe destacar el Sypro Ruby®, Molecular Probes (Figura 6). La tinción Sypro Ruby se basa en el uso de una molécula fluorescente muy sensible, que tiene dos picos de excitación a 280 y 450nm y un pico de emisión a 610 nm, por lo que se requiere de aparatos específicos para su utilización. La tinción Sypro Ruby tiene una sensibilidad similar a la plata pero la supera en términos de rango dinámico de detección. Esto permite poder detectar y cuantificar sutiles diferencias de cantidades de proteínas, y las proteínas menos abundantes pueden ser visualizadas en el gel (López *et al.*, 2000). A esta ventaja se le une la característica de que permite un análisis cuantitativo muy preciso y fiable, superando la precisión en términos de cuantificación de la tinción de Coomassie y ampliamente la precisión de cuantificación de la tinción de plata.

Los geles siempre deben digitalizarse mediante una foto con una cámara CCD o mediante un escáner en un densitómetro. La imagen digital se procesa con un software específico (PDQuest, Delta2D, SameSpots, REDFIN). En la figura 5 se resumen de forma visual los diversos pasos que deben seguirse para realizar un estudio diferencial de expresión proteica mediante 2-DE.

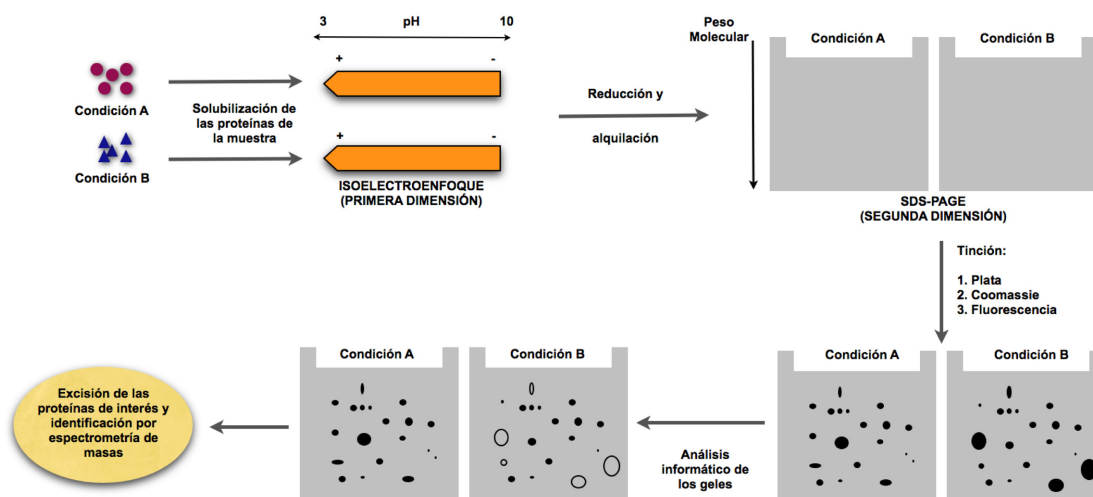


Fig. 5 Resumen visual de los pasos necesarios para realizar un estudio mediante electroforesis bidimensional

3.2. Espectrometría de masas.

El auge de la electroforesis bidimensional en concreto y de la proteómica en general, no podría entenderse sin el espectacular desarrollo que ha sufrido la espectrometría de masas en las últimas décadas. Esto se debe a que las proteínas de interés detectadas en los geles dimensionales deben ser posteriormente identificadas para que el estudio cobre sentido.

Las proteínas pueden ser identificadas por diversos procedimientos, entre los que se incluyen la secuenciación del extremo terminal (secuenciación Edman), composición de aminoácidos o detección con anticuerpos específicos. Todos estos métodos son lentos, laboriosos o caros, y por lo tanto su utilización no resulta apropiada para estudios proteómicos dónde se deben identificar de decenas a cientos de proteínas en un breve período de tiempo. Por ello, debido a su rapidez y elevada sensibilidad, la espectrometría de masas se ha convertido en el método de elección para la identificación de las proteínas a gran escala (Gevaert & Vandekerckhave, 2000; Yates, 2000). Además, también permite la

caracterización de las modificaciones post-traduccionales, las que, como ya se ha mencionado anteriormente, tienen una elevada relevancia fisiológica.

El análisis de las proteínas mediante espectrometría de masas ha sido posible gracias al desarrollo de varios métodos de ionización suave de las proteínas, con lo que se consigue dotar a las proteínas de una sola carga positiva sin llegar a romperlas o destruirlas.

Los espectrómetros de masas están formados al menos por una fuente de iones, un analizador de masas y un detector que mide la relación masa/carga (m/z) de los iones en fase gaseosa.

Para analizar las proteínas, éstas deben ser convertidas en péptidos mediante proteólisis, generalmente con tripsina, una enzima peptidasa que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño.

El análisis por espectrometría de masas implica:

- La conversión de los péptidos en iones en fase gaseosa mediante técnicas de ionización suave, como ionización desorción con láser asistida con matriz (MALDI) a partir de una muestra en estado sólido, o la ionización mediante electrospray (ESI) de una muestra en solución.
- Separación de los iones según su m/z en un analizador de masas.
- Fragmentación opcional de algunos de los iones peptídicos.
- Medida de las masas en un detector, obteniendo el espectro de masas para proceder a la identificación de la proteína en las bases de datos.

Aunque se han desarrollado diversas combinaciones de fuente de ionización y de analizadores de masas, la fuente de MALDI se suele acoplar a un analizador tipo TOF (*Time Of Flight*) o a dos TOF en tándem, mientras que la ionización mediante ESI normalmente se combina con un triple cuadrupolo con una trampa iónica.

Para la identificación de las proteínas se han desarrollado dos estrategias:

- Identificación mediante huella peptídica o mapeo peptídico utilizando un espectrómetro tipo MALDI-TOF. De forma abreviada a este tipo de análisis se le denomina análisis de masas (MS).
- Identificación mediante fragmentación de péptidos obteniendo la secuencia total o parcial de los aminoácidos utilizando un espectrómetro de masas en tándem. A este método se le denomina de forma abreviada masas/masas (MS/MS).

3.3. Cromatografía multidimensional

Para no tener las limitaciones asociadas a los geles en la separación y caracterización de las proteínas, se han llevado a cabo otras aproximaciones proteómicas utilizando cromatografía bidimensional. Los investigadores se han decantado por la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en tándem. Esta técnica permite la separación y cuantificación de proteínas. La HPLC en tándem combina dos tipos diferentes de cromatografía mediante la conexión de dos columnas. Habitualmente la primera columna es de cambio iónico, separación por carga, y la segunda de fase inversa, separación por hidrofobicidad (Walters *et al.*, 2001). Aunque este sistema permite la separación de proteínas y péptidos indistintamente, se ha observado un mayor rendimiento en la separación de péptidos que en la separación de proteínas. Por ello, una vez solubilizada la muestra, el conjunto de las proteínas se digiere con proteasas (habitualmente tripsina), produciéndose una mezcla compleja de péptidos que son separados en el HPLC. Entre las ventajas que ofrecen estos métodos respecto a la electroforesis bidimensional se encuentran una mayor capacidad de carga de muestra, lo cual es importante en el estudio de las proteínas poco abundantes, un mayor rango dinámico de detección y la posibilidad de automatización (Walters *et al.*, 2001).

Los métodos de *shotgun proteomics* deben ir precedidos de un marcaje de las proteínas con isótopos estables para poder cuantificar los cambios de expresión de las proteínas de las muestras estudiadas. El método más utilizado para realizar este tipo de marcaje es el método iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and*

Absolute Quantification, Applied Biosystems) (Ross *et al.*, 2004). Este método consiste en la unión covalente del reactivo iTRAQ con el extremo N-terminal de los péptidos generados por la digestión de las proteínas de la muestra a comparar. Existen hasta 8 reactivos iTRAQ diferentes lo que permite poder analizar 8 muestras en un mismo experimento. Una vez se ha producido la unión covalente, los péptidos marcados con el reactivo iTRAQ de las muestras se mezclan y se procesan en un HPLC y se analizan mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). La fragmentación de los péptidos se utiliza para realizar la búsqueda del péptido concreto mientras que la presencia del reactivo iTRAQ permite la cuantificación relativa del péptido.

Aunque existen otras técnicas utilizadas en el campo de la proteómica, estas están fuera del ámbito de esta introducción, la cual no pretende ser una introducción exhaustiva sobre todas las metodologías existentes, sino describir de forma breve y concisa las metodologías más ampliamente utilizadas en el campo de la proteómica hasta la fecha. En el segundo capítulo de esta Tesis Doctoral pueden encontrarse dos publicaciones que abarcan de una forma más detallada los aspectos relacionados con la proteómica en general (Bermúdez-Crespo & López, 2007b) y con la electroforesis bidimensional en particular (Bermúdez-Crespo & López, 2007a).

4. APLICACIONES PROTEÓMICAS

Los estudios proteómicos se realizan cuando se quieren estudiar los cambios en los niveles de expresión proteica, a gran escala, en dos o más condiciones diferentes pero definidas. Estos estudios pueden tener una hipótesis preestablecida o se pueden llevarse a cabo sin que exista ningún tipo de hipótesis previa en el estudio. Es en este segundo caso, en el cual no se ha establecido ninguna hipótesis previa, donde la proteómica aventaja a otras técnicas de determinación de la expresión proteica como la electroforesis SDS-PAGE convencional o el Western blot.

Son muchos y muy diversos los campos de la ciencia que se han ayudado de las técnicas proteómicas para dilucidar nuevas hipótesis que nunca hubiesen podido (o hubiesen llevado mucho más tiempo) ser planteadas utilizando las técnicas de biología molecular convencional. Por ello, la metodología proteómica se ha utilizado para realizar investigaciones en campos tan diferentes como:

Ciencia de la Salud:

- Las metodologías proteómicas han sido ampliamente utilizada en el campo de la salud. Prácticamente todas las disciplinas dentro de la medicina han utilizado las técnicas proteómicas para estudiar las enfermedades a nivel de expresión proteica global. Debido a la gran demanda de conocimiento sobre las posibilidades de las técnicas proteómicas en el campo de la salud durante la realización de esta tesis, se han publicado dos revisiones sobre el impacto de la proteómica en general (Bermúdez-Crespo & López, 2007a) y de la electroforesis bidimensional en particular (Bermúdez-Crespo & López, 2007b) en el estudio de las enfermedades humanas (Ver **Capítulo 1** de la presente Tesis Doctoral).

Microbiología:

- Taxonomía bacteriana (identificación de la proximidad entre cepas cuando su análisis filogenético por ADN es pobre debido a la ausencia de base de datos de ADN) (Balboa *et al.*, 2011; Dopson *et al.*, 2004)
- Identificación de las proteínas que confieren virulencia a una cepa bacteriana (Kuboniwa *et al.*, 2012; Malmström *et al.*, 2011)
- Estudio masivo de la expresión proteica de un microorganismo cuando existe poca o muy poca información de la misma a nivel ADN (realización de *reference maps* bacterianos) (Bermúdez-Crespo *et al.*, 2012; Coelho *et al.*, 2004)

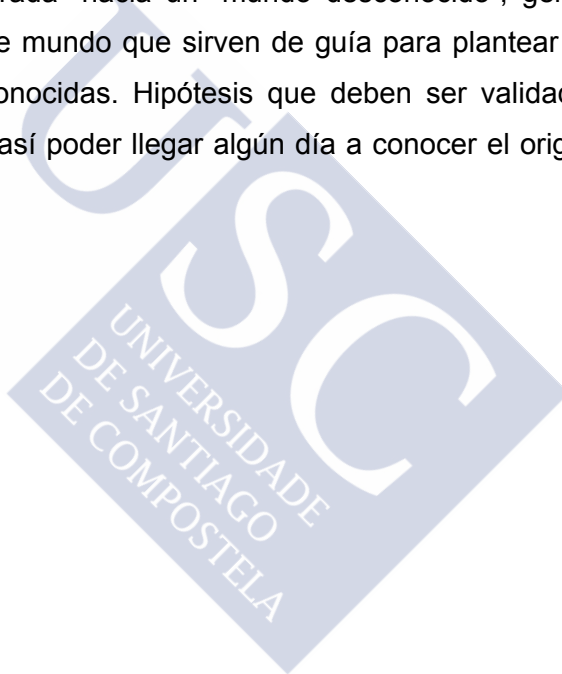
Botánica y Fisiología vegetal:

- Estudios de ecotoxicología (estudio de los cambios de la expresión de proteínas involucradas en la respuesta toxicológica para utilizarlas como biomarcadores) (Boquete *et al.*, 2013; Lingua *et al.*, 2012)
- Estudios proteómicos del polen, endosperma, amilopláastos, cloroplastos etc.. (Dai *et al.*, 2007; Peltier *et al.*, 2000)
- Estudios proteómicos sobre la simbiosis Planta-microorganismo (Khaatun *et al.*, 2012; Barneah *et al.*, 2006)
- Estudios de expresión proteica entre diferentes variedades de una misma planta de una misma planta. (De la Fuente *et al.*, 2011)

El problema más común que existe al utilizar las técnicas proteómicas como herramienta principal de análisis es que los estudios no suelen pasar a un siguiente nivel de investigación. En resumen, se realiza el análisis proteómico, se encuentran unas proteínas que tiene su expresión alterada entre las condiciones estudias, se confirma la diferencia de expresión de alguna de ellas, normalmente de 2 o 3 proteínas por Western blot, se realiza una búsqueda bibliográfica en la que estén implicadas la mayoría de estas proteínas y se postula un hipótesis

conforme a la información encontrada en la bibliografía que casi nunca es validada por otro métodos.

Esta forma de trabajar es válida siempre que se trate de estudios descriptivos como los *reference maps* mencionados en el campo de la microbiología o los estudios taxonómicos en general. Pero cuando se realizan estudios comparativos en los que se quiere llegar encontrar el origen de la problemática planteada en el estudio, es necesario plantear y realizar más estudios posteriores para confirmar la hipótesis generada a partir de los resultados de los estudios proteómicos. Por ello la proteómica, en estos estudios, debería ser una herramienta que hace de “puerta de entrada” hacia un “mundo desconocido”, generando unos conocimientos sobre ese mundo que sirven de guía para plantear nuevas hipótesis previamente desconocidas. Hipótesis que deben ser validadas mediante nuevos experimentos y así poder llegar algún día a conocer el origen de la problemática estudiada.







OBJETIVOS



OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis ha sido el diseño e implementación de una metodología común para el estudio del proteoma de cualquier organismo mediante la electroforesis bidimensional de una forma precisa, reproducible y eficaz, desde la recepción de las muestras hasta su análisis posterior mediante un software específico para dicho fin.

Este objetivo se ha llevado a cabo mediante la aplicación de la electroforesis bidimensional en diversos grupos taxonómicos utilizando un buffer de extracción de proteínas común para todos los estudios:

- Bacteria: *Vibrio tapetis*
- Planta: Briofitos (*Pseudoscleropodium purum*)
- Mamíferos: Ratón (*Mus musculus*)

Dentro del estudio de cada grupo taxonómico se persiguieron diferentes objetivos secundarios.

1. Objetivos del estudio en *Vibrio tapetis*:

Obtención del primer mapa proteómico de referencia de las dos cepas más importantes de *Vibrio tapetis* implicadas en la enfermedad del Anillo Marrón que afecta a almejas, para poder conocer y estudiar las similitudes y diferencias de estas dos cepas a nivel proteico.

2. Objetivos del estudio en *Pseudoscleropodium purum*:

Obtención de evidencias sobre la adaptación fisiológica del musgo a la contaminación atmosférica, mediante el estudio de alteraciones proteicas en

trasplantes cruzados de musgos entre zonas libres de contaminación y zonas con contaminación atmosférica.

3. Objetivos del estudio en *Mus musculus*:

Aplicación de la electroforesis bidimensional como vía de entrada en el estudio de función del gen *pitx2* durante el desarrollo cardíaco, mediante la búsqueda de proteínas alteradas en los corazones adultos de ratón debidas a la inhibición del gen *pitx2* durante el desarrollo cardíaco fetal.

Durante la realización de esta tesis se publicaron dos artículos de revisión del estado de la metodología. Estas publicaciones son la consecuencia del intenso estudio y revisión de la metodología existente para la puesta a punto y aplicación de la electroforesis bidimensional en las especies anteriormente mencionadas. En el **Capítulo 1** se incluyen una copia de estas dos publicaciones para introducir al lector en el campo de la proteómica de una forma más profunda y específica.





CAPÍTULO 1

Possibilities of Two-Dimensional Gel Electrophoresis in the Understanding of Human Disease

José Bermúdez-Crespo and José Luis López*

Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Santiago de Compostela. 15782 Santiago de Compostela, Spain

Abstract: Because of the multifactorial nature of many diseases, two-dimensional electrophoresis is a basic proteomics tool for its ability of simultaneously detecting post-and co-translational modifications, which cannot be predicted from genome sequences.

This review describes the central role of proteomics tool, two-dimensional electrophoresis for clinical biomarker discovery, the identification of prognostic and diagnostic markers, their use in monitoring the effects of drug treatments and eventually finding more efficient and safer therapeutics for a wide range of pathologies.

Key Words: Proteomics, two-dimensional electrophoresis, biomarker discovery, drug discovery, clinical applications.

<http://benthamscience.com/journal/abstracts.php?journalID=cp&articleID=92438>

A better understanding of molecular mechanisms underlying human disease

José Bermúdez-Crespo and José Luis López

Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

This review summarises and discusses the degree to which proteomics is contributing to medical care, providing examples and signposts for future directions. Why do genomic approaches provide a limited view of gene expression? Because of the multifactorial nature of many diseases, proteomics enables us to understand the molecular basis of disease, not only at the organism, whole-cell or tissue levels, but also in subcellular structures, protein complexes and biological fluids. The application of proteomics in medicine is expected to have a major impact by providing an integrated view of individual disease processes. This review describes several proteomic platforms and examines the role of proteomics as a tool for clinical biomarker discovery, the identification of prognostic and earlier diagnostic markers, their use in monitoring the effects of drug treatments and eventually find more efficient and safer therapeutics for a wide range of pathologies.

Keywords:

Biomedical applications / Fluid biomarker / Human disease / Tissue biomarker

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prca.200700086/abstract;jsessionid=7594FF60D64FD3CEA337D1C2F3E5E14B.f01t01>



CAPÍTULO 2

ORIGINAL ARTICLE

Two-dimensional proteome reference map of *Vibrio tapetis*, the aetiological agent of brown ring disease in clams

J. Bermúdez-Crespo¹, S. Balboa², J. Alonso³ and J.L. Romalde²

¹ Departamento de Genética, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

² Departamento de Microbiología y Parasitología, CIBUS-Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

³ Servicio de Proteómica, Fundación IDICHUS, Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela, Spain

Keywords

de novo sequencing, MALDI-TOFF, proteome, reference map, *Vibrio tapetis*.

Correspondence

Jesús L. Romalde, Departamento de Microbiología y Parasitología, CIBUS-Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Vida s/n. 15782, Santiago de Compostela, Spain. E-mail: jesus.romalde@usc.es

2011/2115: received 14 December 2011, revised 14 February 2012 and accepted 21 February 2012

doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05271.x

Abstract

Aims: *Vibrio tapetis* is the etiological agent of brown ring disease (BRD) in clams, one of the most threatening diseases affecting this commercially important bivalve. In this study we have constructed a proteome reference map of the *V. tapetis* type strain CECT 4600^T.

Methods and Results: Eighty-two proteins, consistently present in all 2D-gels, were identified by mass spectrometry or by *de novo* sequencing. The majority of the proteins identified (66%) belonged to four COG categories: 'Carbohydrate transport and metabolism', 'Post-translational modification, protein turnover and chaperones', 'Energy production', and 'Amino acid transport and metabolism'. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, enolase, fructose-bisphosphate aldolase, phosphoglycerate kinase, molecular chaperones Dnak and GroEL, alkyl hydroperoxide reductase, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B and factor Tu, were identified among the 20 most abundant proteins. A comparison of this reference map with that obtained for the *V. tapetis* strain GR0202RD, with different origin and pathophysiological characteristics, was performed.

Conclusions: Under the culture conditions employed in this study, glucose degradation is one of the major pathways for energy production in *Vibrio tapetis*. In addition, the two strains studied, although with remarkable differences at genetic and pathophysiological levels, showed a high similarity under laboratory conditions.

Significance and Impact of the Study: The results obtained here can be considered as a first step to gather valuable information on protein expression, related not only to diverse cellular functions and regulation but also to pathogenesis and bacterium-host interactions in the disease process.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2012.05271.x/abstract>



CAPÍTULO 3

Assessing the effects of heavy metal contamination on the proteome of the moss *Pseudoscleropodium purum* cross-transplanted between different areas

M. Teresa Boquete · José Bermúdez-Crespo ·
Jesús R. Aboal · Alejo Carballeira · J. Ángel Fernández

Received: 3 June 2013 / Accepted: 6 September 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Protein expression was assessed in samples of *Pseudoscleropodium purum* cross-transplanted between one unpolluted (UNP) and two polluted (POLL) sites. Firstly, the level of expression (LE) of 17 proteins differed between native mosses from both types of sites, but differences were only maintained throughout the experiment for 5 of them. The LE of these five proteins changed over time in mosses transplanted from UNP to POLL and vice versa, becoming similar to that in autotransplants. However, these changes occurred slower than changes in the heavy metal concentrations measured in the same samples, and therefore they were not related to atmospheric pollution. Although the proteins identified were associated with moss metabolism, the expected growth reduction in samples autotransplanted within POLL (as a result of the down-regulation of photosynthesis-related proteins), did not occur. This supports the hypothesis that mosses growing in polluted areas adapt to heavy metal pollution and are able to reduce/overcome their toxic effects (i.e., reduced growth). Nevertheless, further specific research must be carried out to identify the proteins involved in this type of response, as lack of information on the bryophyte genome precludes us from reaching further conclusions.

Keywords Air quality · Passive biomonitoring · Terrestrial mosses · Proteomics · Heavy metals · Adaptation

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11356-013-2141-8>



CAPÍTULO 4

El estudio incluido en el **Capítulo 4** aún no ha sido enviado para publicación. Se presenta en formato Artículo para no romper la homogenidad de la Tesis.



PROTEOMIC ANALYSIS REVEAL THAT PITX2 INSUFFICIENCY LEADS TO A METABOLIC CARDIAC REMODELLING

José Bermúdez-Crespo¹, Ana Chinchilla², Diego Franco^{2*}, Amelia E. Aránega^{2*}

¹ Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Santiago de Compostela; Spain.

² Department of Experimental Biology, University of Jaén; Spain.

Corresponding authors: Amelia Aránega and Diego Franco. Address: Department of Experimental Biology, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Paraje de las Lagunillas, s/n, Jaén, Spain. Phone: 0034 953212604. Fax: 0034 953211875. E-mail address: aaaranega@ujaen.es, dfranco@ujaen.es.

Abstract

The heart is the first embryonic organ to display morphologic asymmetry during development. Pitx2 is a homeobox transcription factor involved in left-right signaling during embryogenesis. Loss of Pitx2 expression in LPM results in severe cardiac malformations, including right cardiac isomerism.

Recent genomic and functional studies in mice and humans strongly implicate Pitx2 as an upstream regulator of pro-arrhythmogenic events providing evidences about the role of the homeobox transcription factor PITX2 in the genesis of atrial arrhythmias. However, the role of Pitx2 in the developing fetal and adult ventricle is poorly understood. In this work we show for the first time that a ventricular chamber-specific Pitx2 insufficiency leads to cardiac disfunction providing new knowledge about the link between Pitx2 insufficiency and cardiac remodeling. This hypothesis is supported by the identification of expression alterations in many proteins implicated in cardiac metabolism by a proteomic approach. Besides, we have found an overexpression of GLUT-1 and a dramatically inhibition of PPAR α mRNAs suggesting a shift of energy substrate preference from fatty acid to glucose oxidation as occurs in left ventricular dysfunction and ischemic cardiomyopathy. Quantification of heart capillar density has demonstrated that adult null heart are more capillarized than control mice suggesting a existence of previous neoangiogenesis as mechanism to counteract past ischemic events.

The combination of these findings suggest that ventricular chamber-specific Pitx2 insufficiency can determine a metabolic cardiac remodelling compatible with cardiac hypertrophy and cardiac ischemia.

INTRODUCTION

Pitx2 is a member of the bicoid family of homeodomain that plays a pivotal role in the left-right determination, downstream of nodal/lefty signalling pathway (Burdine and Schier, 2000). Molecular studies have demonstrated that Pitx2 is expressed as several isoforms, Pitx2a and Pitx2b are generated by alternative splicing mechanisms, whereas Pitx2c uses an alternative promoter upstream of exon 4 (Schweickert et al. 2000). The role of Pitx2 during heart development has been studied extensively. Pitx2 expression starts early in the development and is confined to the left of the embryo. With further development, it continues restricted to the left side in different organs as the heart, where its expression is maintained inclusive in

the adult heart. (Schweickert et al. 2000; Campione et al. 2001). Pitx2abc^{-/-} mice display early embryonic lethality with severe cardiac malformations (Kitamura et al. 1999; Gage et al. 1999). Isoform-specific deletion of Pitx2c has similar cardiac malformations as those from Pitx2abc^{-/-} mice, suggesting that among these three isoforms, Pitx2c is the major isoform during cardiogenesis [Schweickert et al. 2000; Liu et al. 2001].

In contrast, the role of Pitx2 in foetal and adult heart is far from being elucidated. Recently independent studies have suggested new roles for Pitx2 in the adult heart (Gudbjartsson et al. 2007; Käåb et al. 2009). Gudbjartsson et al. firstly reported a genetic variant on chromosome 4q25 that associates with atrial fibrillation (AF). PITX2 gene is the closer gene to this region where the genetic

variant has been detected. These studies do not provide any experimental evidence that links regulation of PITX2 expression/activity to the risk variants, but recent studies have elucidated consistent evidences of PITX2 implication in AF (Wang et al. 2010, Kirchhof et al. 2011). Besides, our group has demonstrated that Pitx2c expression is significantly decreased in human patients with sustained AF, and that chamber specific deletion of Pitx2 in mice atria conduces to electrophysiological alterations (Chinchilla et al. 2011)

Although there are some studies which focused in the role of Pitx2 in adult atria and are elucidating its function, the role of Pitx2 in the developing foetal and adult ventricle remain elusive. Thus, after showing evidence that Pitx2 is an upstream transcriptional regulator of distinct pathways that provide cellular, molecular and electrophysiological substrates linked to atrial fibrillation, our group have focused their efforts in study the role of Pitx2 in the ventricular myocardium (Data not published). In this way, we have recently demonstrated ventricular chamber-specific (MLC2vCre) deletion of Pitx2 results in viable offspring but display electrophysiological defects that lead to QRS widening. These electrophysiological alterations in both atria and ventricle specific Pitx2 null mice suggest an important role of Pitx2 for the normal function in the adult heart. Thus in this work, we have used a proteomic approach as a non hypothesis driven research method to elucidate unknown molecular and pathways alterations that are consequence of ventricular chamber-specific Pitx2 insufficiency. By using this approach, we have detected changes in the expression of several proteins implicated in cardiac metabolism. The identity of these proteins suggests that a shift of energy substrate preference from fatty acid to glucose is happening in these hearts. This hypothesis is corroborated by the up-regulation of GLUT-1 and dramatic inhibition of PPAR- α mRNAs. Besides, we demonstrated that ventricular myocardium of Pitx2 null mutant mice is subjected to a neoangiogenesis process, which is very common response to oxygen deprivation situations.

MATERIAL AND METHODS

Transgenic mouse lines and breeding strategy

The Pitx2floxed and Mlc2v-Cre transgenic mouse lines have been previously described (Gage et al. 1999). Generation of conditional ventricular (Mlc2v-Cre) mutant mice were performed by intercrossing homozygous Cre deleter mice with homozygous Pitx2floxed mice. Double heterozygous were selected by PCR and subsequently crossed with homozygous Pitx2floxed mice, respectively, yielding to wild-type (Cre-) (i.e. Mlc2vCrePitx2^{fl/fl}), heterozygous (i.e. Mlc2vCrePitx2^{fl/-}) and homozygous Cre+/Floxed (i.e. Mlc2vCrePitx2^{-/-}). Since conditionally-deleted homozygous were viable to adulthood, mice were bred into a pure C57B1/6J genetic background, and offspring was routinely screened for the presence of Pitx2 floxed allele and the Cre sequence as previously reported (Tessari et al. 2008). This investigation conform the Guide for the Care and Use of Laboratory Animal published by the US National Institutes of Health.

Adult mice and female pregnant mice were killed by cervical dislocation and adult whole hearts as well as embryonic whole hearts from embryonic day (E) E18.5 were isolated as previously described (Domínguez et al. 2008).

Mouse genotyping

DNA for PCR screening was extracted from a adult ear and/or tail samples and from embryonic yolk sacs. Screening of Cre and Pitx2 floxed alleles was routinely done using specific primers as described previously (Chinchilla et al. 2011). Cycling conditions for Cre were as follows; 5 min at 95°C, 35 cycles of 30s at 95°C, 30s at 60°C and 90s at 72°C, and for Pitx2 as follows; 5 min at 95°C, 40 cycles of 30s at 95°C, 30s at 60°C and 90s at 72°C, followed by a final extension step of 10 min at 72 °C, respectively.

Confocal imaging

Adult hearts were carefully dissected and briefly rinsed in Ringer's solution and photographed. Samples processed for immunohistochemistry were fixed overnight in freshly made sterile 4% paraformaldehyde. Adult and embryonic samples processed for immunohistochemistry were dehydrated through grade

ethanol steps and embedded in paraplast. Sections were cut at 10 μ m and immunostained with lectin from *Triticum vulgaris* (WGA lectin) biotin conjugate (Sigma) diluted 1:50 in 1% Triton X-100 PBS solution overnight. After three washes in PBS of 10 min, sections were incubate 1h against Avidin-FITC (Sigma) (1:100 dilution in PBS). After two 5 min washes in PBS, sections were incubate 10 min with DRAQ-5TM (Red Fluorescent Cell-Permeable DNA probe, Biostatus Limited) (1:1000 dilution in PBS). Finally, section were washed 5 min twice with PBS and were mounted in temporal assembly PBS:glycerol (1:1).

Confocal analysis for capillaries detection was carried out using a Leica TCS SL confocal microscope (Leica LCS version 2.0). Two images of interventricular septum, left ventricle and right ventricle were acquired in each section. Three sections per sample and three samples of each condition Wild-type and *Mlc2vCrePitx2^{-/-}* null mutant were analysed. All samples were analysed in triplicate. All adult and embryonic ventricle images were captured at 40X and saved in TIFF format. Images analysis was carried out using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Images were imported to ImageJ, and background subtraction was made as first step. Then, all images were converted to 8 bits and binary format. Capillaries number was obtained using the “analyse particles” option (ImageJ>Analyse>Analyse Particles). In order to eliminate artefacts, size limit were established between 10 and infinity (cm^2).

Sample preparation for 2DE

Adult hearts were carefully dissected, briefly rinsed in Ringer's solution and stored at -80°C . Frozen ventricles were lyophilised during four days. Then, tissues were homogenised in a mortar. Proteins were extracted by suspending 20 mg of lyophilised homogenised tissue in 1 mL of standard lysis buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS and 10 mM DTT) during 3 hours at 27°C . Next, samples were centrifuged at 14000 rpm for 30 min. The resulting supernatants were collected and protein concentration was measured with CB-X protein assay kit (Gbiosciences). Finally, samples were stored at -80°C prior to use.

Isoelectrofocusing was performed using a Protean IEF cell (Bio-Rad) and 24 cm pH 4-7

IPG strips (GE Healthcare). 100 μ l of protein (1mg) was mixed 350 μ l of rehydration buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 0.6 % DTT, 1% IPG buffer 4-7 and bromophenol blue traces) and loaded in each strip by in-gel-rehydration method (Görg et al. 1995). IEF was carried out at 20°C and according to the following steps: active rehydration (50V) for 12h, 250 V for 30 min, 500 V for 1h, 1 000 V for 1h, 4000 V for 2h, 8000 V for 2 h and 10000 V to achieve 65 kVh. After IEF, strips were stored at -20°C until used in second dimension. Prior to run the second dimension, strips were first equilibrated at room temperature in equilibration solution (6M urea, 50mM Tris-HCl pH 8.8, 30% glycerol) with the addition of 1% DTT for 15 min, followed by the same solution with the addition of 2.5% of iodoacetamide other 15 min. Strips were fixed with sealed solution (25mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, 0.5% agarose, 0.01% bromophenol blue) on top of a 21 x 26 cm 12,5% polyacrilamide gel. Second dimension was performed according to Laemmli (Laemmli, 1970), overnight at 10°C in a EttanDalt-Six (GE Healthcare) and stopped when the bromophenol blue dye front just left the bottom of the gels. Gels were stained with CBB. CBB staining was carried out according to Neuhoﬀ's protocol with minor modifications (Neuhoﬀ et al. 1988). Gels were fixed in 50% ethanol, 3% phosphoric acid for 3 h and then washed in H_2O three times for 20 min each. The gels were pre-incubated in 34% methanol, 17% sulphate ammonium, 3% phosphoric acid for 1 h. Next, 0.35 g/L of Coomassie Blue G-250 (Bio-Rad) was added to this solution. Each gel was stained alone in a plastic box with 330 mL of this solution during for four days to reach maximum intensity of the staining. Finally the gels were washed in H_2O twice for 25 min each and scanned in a densitometer (Mikrotek 9800XL) at 300 dpi resolution. Digitalised images were saved in TIFF format and gels were stored in vacuum-sealed plastic bags at 4°C . PDQuest Advance software (Bio-Rad) were used for spot detection, spot quantitation and statistical analysis of 2DE images. After automatic spot detection and spot matching were performed, matching errors were manually inspected and corrected. Correlation coefficients between all gels where studied in order to assess 2-DE reproducibility. Quantitative and qualitative

analysis of spot intensity were carried out. Quantitative analysis covered proteins which had statistically significant differences between classes by means of Mann-Whitney U-Test ($p < 0.01$). Qualitative analysis detected proteins that appeared in one group but were absent in the other group.

Protein identification

Protein spot that were revealed as statistically different were excised from Coomassie-blue-stained 2-DE electrophoresis gels. Each protein was digested in situ with trypsin as previously described (De la Fuente et al. 2010). An aliquot (0.5 μ l) of the reaction mixture was analysed by a MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight) type of MS using an Autoflex model of Bruker Daltonic (Bremen, Germany), equipped with a reflector, and employing 2,5-dihydroxybenzoic acid as matrix and an Anchor-Chip surface target (Bruker Daltonic). External calibration was carried out using a set of synthetic peptides (Bruker Daltonics) added to the target in positions close to samples. The tryptic peptide maps obtained experimentally were assigned by comparing their masses with the database. MASCOT (Matrix Sciences, London, UK) was used for database search (<http://www.matrixscience.com>).

Western blot analyses

Western blot analyses for Aldolase A, GRP78 and Succinyl-CoA synthetase were performed utilizing standard procedures. For all proteins detection, forty micrograms of total cellular proteins were loaded and resolved in a standard 12,5% SDS polyacrylamide gel (SDS-PAGE). The separated proteins were then electro-blotted onto PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane (Immobilon P, Millipore Co) and transference efficiency was evaluated by Ponceau Red staining after blotting. Membranes were blocked and subsequently incubated 2h at room temperature with polyclonal antibodies against Aldolase A (1:1000 dilution, monoclonal Sigma), GRP78 (1:2000 dilution, casa comercial) and Succinyl-CoA Synthetase (1:1000 dilution, BD Transduction Laboratories), and the house-keeping control α -tubulin (1:7000 dilution, Sigma). Horseradishperoxidase (HRP)-conjugated secondary antibody during 1h, enhanced chemiluminescence (ECL Plus) detection reagents (GE Healthcare) were used to

detected immunoreactive bands. Chemiluminescence signal were detected with Amersham Hyperfilm (GE Healthcare). Quantitative changes in band intensities were evaluated using QuantityOne software (Bio-Rad). The densitometric values of the Western blot bands containing the proteins of interest were normalized against those of α -tubulin obtained from the same membranes. Relative abundance of each protein was calculated by obtaining the ratio of the normalized densitometric values between wild-type and Mlc2vCrePitx2^{-/-} null mutant samples. Three different samples of each condition were used in this analysis.

mRNA isolation and Reverse Transcription

Dissected ventricular myocardial tissues from wild-type and Mlc2vCrePitx2^{-/-} null mutants adult hearts were collected and independently stored in liquid nitrogen before RNA isolation. RNA extraction was performed in triplicates using a single ventricular myocardium sample of either wild -type or Mlc2vCrePitx2^{-/-} null mutants, respectively. Total RNA was isolated using Trizol (Roche) according to manufacture's guidelines and DNase treated using RNase-Free DNase (Roche) for 1h at 30°C. In all cases, at least three distinct samples were used to perform the corresponding qRT-PCR experiment.

First strand cDNA was synthesized iScript cDNA kit (Bio-Rad) according to manufacture's protocol. Negative controls to assess genomic contamination were performed for each sample.

qRT-PCR

RT-PCR was performed in Mx3005Tm QPCR System with a MxPro QPCR Software 3.0 (Stratagene) or in CFX96™ Real-Time PCR Detection System with a CFX Manager software (Bio-Rad) and SyBR Green detection system. Reactions were performed in 96-well plates with optical sealing tape in 20 μ l total volume containing SYBR Green Mix (Bio-tools) and the corresponding cDNA. Amplification conditions were as follows: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30s, 60°C for 30s, 72°C for 30s; with final elongation step of 72°C for 10 min. All primers were designed to span exon-exon boundaries using online Primer3Plus website (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, see Appen-

dix 1). Each PCR reaction was performed at least three times to obtain representative averages. GAPDH were used as internal control in each run. The Livak method was used to analyse the relative quantification RT-PCR data (Livak & Schmittgen, 2001). In all cases, normalized was performed by taking as 100% the wild-type value, as previously described (Dominguez et al. 2005).

RESULTS

2-DE gels quality

To explore the molecular changes that are occurring in MLC2vCrePitx2^{-/-} hearts, we have performed a 2-DE/MS analysis of MLC2vCrePitx2^{-/-} as compared to control hearts. Figure 1 shows standard pattern of ventricle proteins separated by 2-DE using a 24 cm, linear pH 4-7 IPG strip in the first dimension. Automatic analysis detected more than 300 spot in all gels. After manual editing, average final spot number was reduced to 231 ± 11 . 2-DE reproducibility was determined by correlation coefficients between all gels. Among all possible comparison, 153, best and worst correlation coefficient was 0.96 and 0.82 respectively (data not shown). Correlation coefficient average was 0.91, clearly showing a high reproducibility.

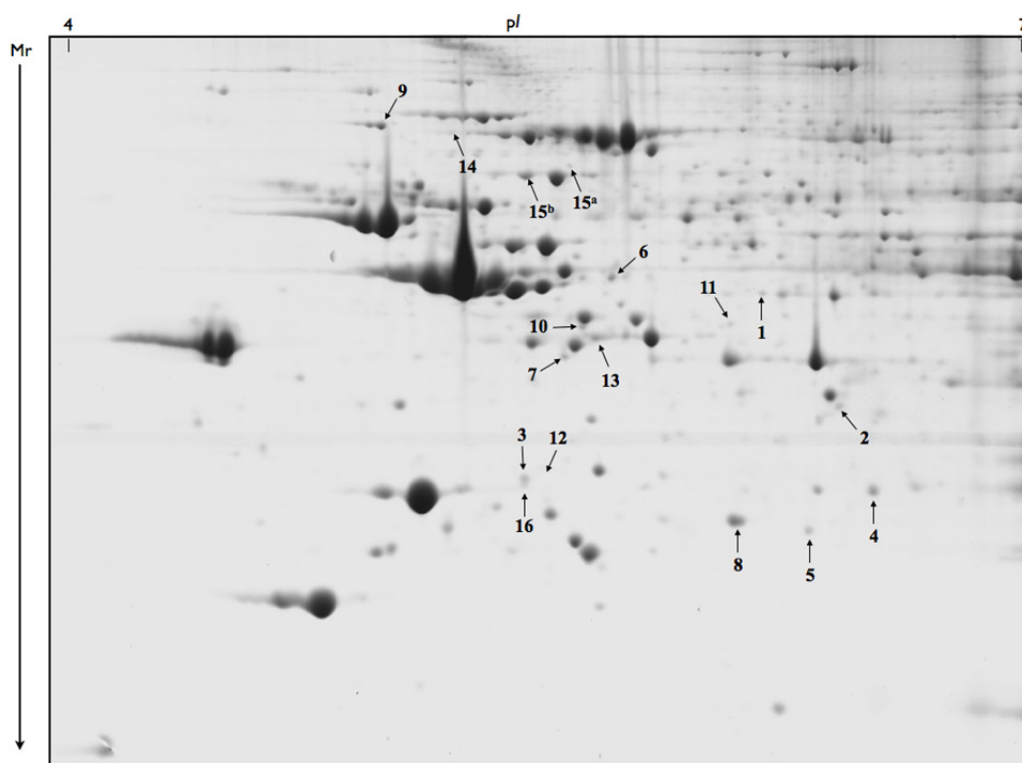
2-DE analysis of MLC2VCrePitx2^{-/-} null mutant ventricles reveals changes in several pathways (mainly proteins associated with metabolism)

To analyse changes in protein expression between ventricles from wild-type and Mlc2vCrePitx2^{-/-} null mutants, only spots, which were present in all gels, were chosen. Statistically significant differences (at least 2-fold) in protein expression between wild-type and Mlc2vCrePitx2^{-/-} null mutant ventricles were detected in 22 proteins by means of Mann-Whitney U-test ($p < 0.01$). Ten proteins were up-regulated in MLC2vCrePitx2^{-/-} gels whereas twelve proteins were down-regulated in the same samples. Selected proteins were identified by MALDI-TOF MS on the basis of peptide mass matching after in-gel trypsin digestion (Henzel et al. 1993). We unambiguously identified a total of 16 proteins from 22 excised spots by means of PMF (Table 1). From the remaining unidentified proteins one protein was identified by MS/MS.

Identified proteins were categorized in several distinct biological groups. Most represent biological groups were metabolism and cellular defence and stress. In metabolism group aldolase A, 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase and succinyl-CoA synthetase increased their relative expression by 196%, 177% and 153% in Mlc2vCrePitx2^{-/-} compared to controls, respectively, whereas L-lactate dehydrogenase B (Ldh-b), Atp5c1, Bckdh and Pp1- β decreased their expression by 149%, 159%, 205%, 208% in Mlc2vCrePitx2^{-/-} compared to controls, respectively. Within the cellular defence and stress group peroxiredoxin-6 was overexpressed in Mlc2vCrePitx2^{-/-} hearts with a relative increase of 194%, whereas Grp78 and Hsp60 were decreased by 197% and 206% in Mlc2vCrePitx2^{-/-} hearts as compared to controls. From remaining differentially expressed identified proteins, three of them, alpha cardiac actin (Acta1), metaxin-2 and 5'-nucleotidase increased their expression in Mlc2vCrePitx2^{-/-} by 175%, 178% and 223% in Mlc2vCrePitx2^{-/-} hearts as compared to controls, respectively. In contrast, protein similar to Zc12d decreased by 317% as compared to controls. 2DE/MS results were further validated by quantitative Western blotting for Aldolase A and Succinyl-CoA synthetase, as these proteins have a crucial role in the glycolysis and in the Krebs cycle. Aldolase A and Succinyl-CoA synthetase were increased more than 50% ($p < 0.05$) in Mlc2vCrePitx2^{-/-} confirming our 2-DE proteomics results (Figure 2).

Changes in metabolism (aldolase A, Pp1- β and Ldh-B), catabolism of branched-chain amino acids (3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase and Bckdh), nucleotide metabolism protection during ischemia or anoxia (5'-nucleotidase), cell energy production (Succinyl-CoA synthetase and Atp5c1) has been previously demonstrated that they occur in the cardiac remodelling process of several cardiac pathologies. Unpublished results of our group show that Mlc2vCrePitx2^{-/-} hearts display a hypertrophic phenotype. Therefore, these results suggest that a metabolic alteration associated to a cardiac hypertrophy exists.

a)



b)

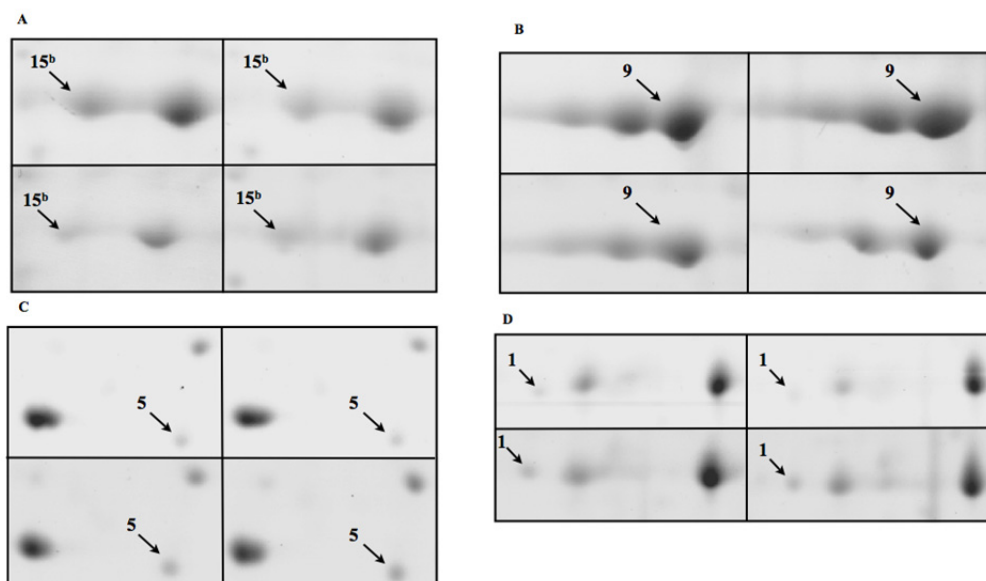


Figure 1. a) Comparison of 2-DE patterns of the cytoplasmic proteins in Wild-type and MLC2vCrePitx2^{-/-}. IEF was carried out using IPG strips (24cm, pH 4-7). A 12,5% SDS gel stained with Coomassie G-250 was used in the second dimension. Three samples and three replicate gels of each condition were made in order to assess inter and intra variability of the method. b) Amplified regions where some differences in protein expression can be observed. Each magnified region is divided into four sections. Upper sections correspond with wild-type gels, lower sections correspond to MLC2vCrePitx2^{-/-} gels. A and B shows downregulated proteins in MLC2vCrePitx2^{-/-} gels, C and D shows overexpressed proteins in MLC2vCrePitx2^{-/-} gels.

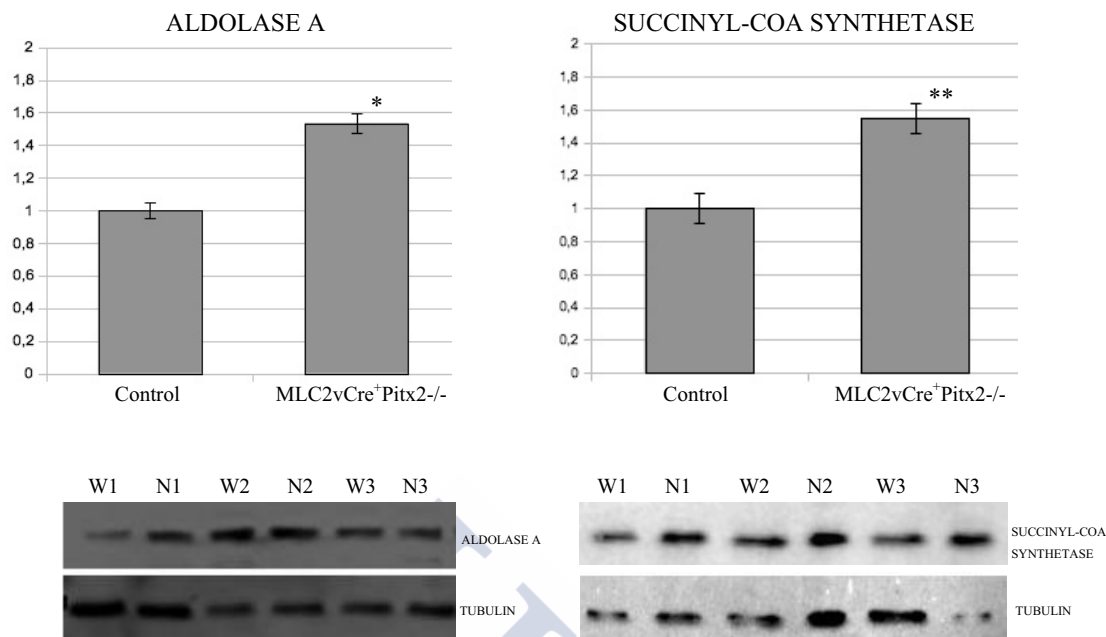


Figure 2

Mlc2vCrePitx2^{-/-} mice display cardiac remodelling associated to a high capillary density

Changes in different metabolic pathways has been previously associated to cardiac hypertrophy as well as to myocardial ischemia (Abozguia et al. 2009; Tsutsui et al. 2009). Furthermore, vascular remodelling is commonly associated with both process. To discern if Mlc2vCrePitx2^{-/-} hearts display morphological changes in the vascular niche, ventricle capillary density was measured in adult Mlc2vCrePitx2^{-/-} hearts as compared to age-matched controls. Interestingly, the interventricular septum (IVS) and left ventricle vascular density increased by 30% ($p < 0.002$) and 20% ($p < 0.035$) respectively, in Mlc2vCrePitx2^{-/-} hearts as compared to age-matched controls whereas right ventricle display no significant differences (Figure 3). However, it is possible that increased vascularization could occur during cardiac development or alternatively as post-natal event, as previously described in other models (Luttun & Carmeliet, 2003). To discriminate between these two possibilities, ventricular capillary density was measured in embryonic hearts of E18.5 embryos. In contrast to the adult situation, the IVS, left ventricle and right ventricle displayed similar capillary density between

Mlc2vCrePitx2^{-/-} null mutants as compared to controls (Figure 3). Thus, these data demonstrate that lack of Pitx2 during heart development does not increased ventricular vasculogenesis. On the other hand, lack of Pitx2 in the adult heart leads to increased vascular bed in the IVS and left ventricle, most likely as consequence of post-birth vessels growth, a process that is commonly observed after ischemic stroke and /or hypertrophic response (Tabibiazar & Rockson, 2001). Curiously, deletion of Pitx2 in ventricles leads to an increase in the number of the capillaries in the ventricular regions that display a hypertrophic phenotype (IVS and LV) (Unpublished results), indicating that vessels increase may be secondary to the hypertrophic process

Cardiac remodelling in Mlc2vCrePitx2^{-/-} hearts leads to switch in metabolic pathways involved in energy production

Fuel generation in the adult myocardium depends on the mitochondrial oxidation of long-chain fatty acids to produce ATP. In normal conditions 60-90% of acetyl-CoA that enters the TCA cycle comes from β -oxidation and remaining 10-40% is generated from pyruvate oxidation. However, in pathological conditions as cardiac hypertrophy or cardiac ischemia fatty acid oxidation rate decreases and glucose

oxidation rate increases (Allard et al. 1994; Shohet & García, 2007). Thus, myocardial remodelling is frequently accompanied by a shift in energy metabolism, moving from fatty acid to glucose oxidation. This phenomenon takes place as an adaptive mechanism with the aim of improving oxygen efficiency coupling to energy production because glucose metabolism consumes less oxygen per unit of ATP generated (Abozguia et al. 2009). Therefore, based on our proteomics analysis which indicated that glycolysis pathway could be altered in MLC2vCrePitx2^{-/-} hearts, we now check changes in the glucose uptake in these transgenic hearts, we also check the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 pathway in order to find out if hypoxia events are occurring in these hearts. qRT-PCR analyses demonstrate that Glut-1 was up-regulated in Mlc2vCrePitx2^{-/-} null mutant ventricles as compared to controls (Figure 4). Surprisingly, HIF-1 α , as well as some other downstream Hif-1 α target genes such as inducible nitric oxide synthase (iNOS), Heme-oxygenase 1 (Ho-1), vascular endothelial growth factor (Vegf) display no significant differences (Figure 4), suggesting that hypoxia response pathway is not altered because the formation of new vessels which supplies more oxygen to the heart.

To further sustain a shift from fatty acid to glucose oxidation, peroxisome proliferator-activated receptor- α (Ppara) expression levels were measured in Mlc2vCrePitx2^{-/-} adult hearts. Ppara receptor regulates basal and fatty acid-induced transcription of β -oxidation enzymes playing thus a critical role on the maintenance of cardiac energy (Leone et al. 1999). As detailed in Figure 4, Ppara mRNA expression was dramatically reduced in the myocardium of Mlc2vCrePitx2^{-/-} null mutants demonstrating a molecular cardiac remodeling in energy metabolism in the adult Mlc2vCrePitx2^{-/-} hearts.

DISCUSSION

Pitx2 is a homeobox transcription factor with an important role of left-right determination in several organs, including heart (Schweickert et al. 2000). Several authors have described cardiac malformations in mice with isoform-specific deletion of Pitx2 (Kitamura et al.

1999; Gage et al. 1999). However the specific role of Pitx2 in the appearance of these cardiac malformations is far to be elucidated. We have generated ventricular-chamber specific conditional Pitx2 mutant mice in order to investigate the consequences of partial inhibition of Pitx2 in the heart. Pitx2 expression in these mutants is reduced by 60-50% as consequence of incomplete Cre recombination (de Lange et al. 2003), displaying mild embryonic morphogenetic defects that are compatible with life.

In this work, we have used a proteomic approach as a descriptive method for providing inventories of proteins and related pathways that are associated with Pitx2 deletion in the MLC2vCrePitx2^{-/-} hearts. With this methodology we found 22 proteins of interest, 10 up-regulated and 12 down-regulated in MLC2vCrePitx2^{-/-} hearts. Based on the identity of these proteins we found that carbohydrate metabolism, catabolism of branched-chain amino acids, nucleotide metabolism protection during ischemia or anoxia and cell energy production pathways are altered in the Mlc2vCrePitx2^{-/-} hearts. Alteration of these pathways is related with a phenomenon called myocardial remodelling, which occurs as consequence of a heart dysfunction (Abozguia et al. 2009; Tsutsui et al. 2009). Myocardial remodelling is defined as alteration in the structure (dimensions, mass, shape) of the heart in response to hemodynamic load and/or cardiac injury in association with neurohormonal activation. It could be physiologic or pathologic and alternatively, may be classified as adaptive or maladaptive.

Proteomic results

In this work, we performed a comparative study on Mlc2vCrePitx2^{-/-} and wild type hearts by bidimensional electrophoresis. We found 22 proteins of interest, 10 up-regulated and 12 down-regulated in MLC2vCrePitx2^{-/-} hearts. The related pathways to these proteins are carbohydrate metabolism (aldolase A, Pp1- β and Ldh-B), catabolism of branched-chain amino acids (3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase and Bckdh), cell energy production (Succinyl-CoA synthetase and Atp5c1) and nucleotide metabolism protection during ischemia or anoxia (5'-nucleotidase). It is well known that alteration of these pathways are associated with the pathophysiology of heart

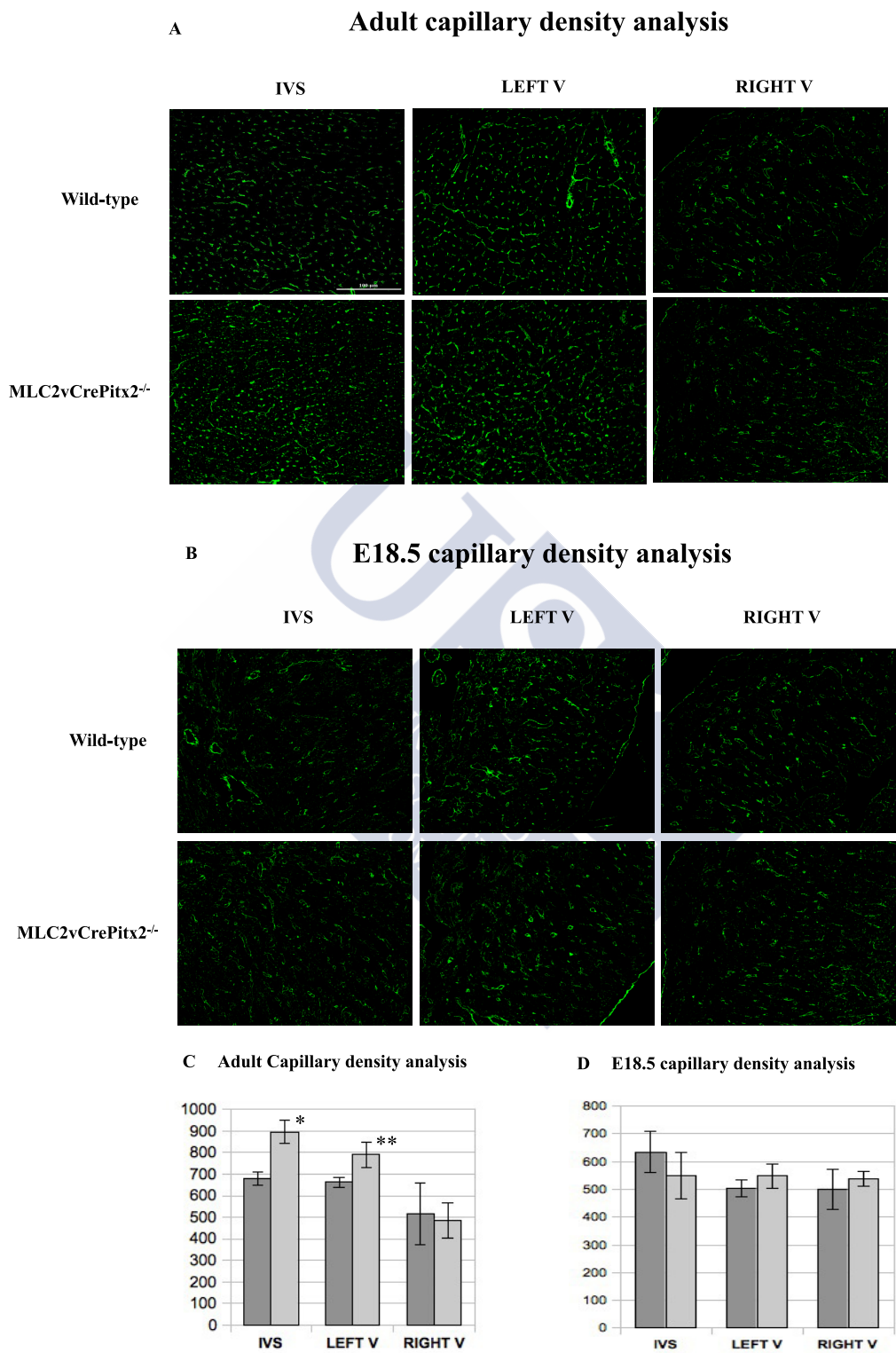


Figure 3. (A) 40X confocal images of wild-type and MLC2vCrePitx2^{-/-} adult ventricles, (B) 40X confocal images of wild-type and MLC2vCrePitx2^{-/-} E18.5 embryonic ventricles. (C) Capillary numbers in wild-type and MLC2vCrePitx2^{-/-} adult ventricles, (D) Capillary numbers in wild-type and MLC2vCrePitx2^{-/-} E18.5 embryonic ventricles. IVS = interventricular septum, LV = Left ventricle, RV = Right Ventricle, * p = 0,0022, ** p = 0,0354.

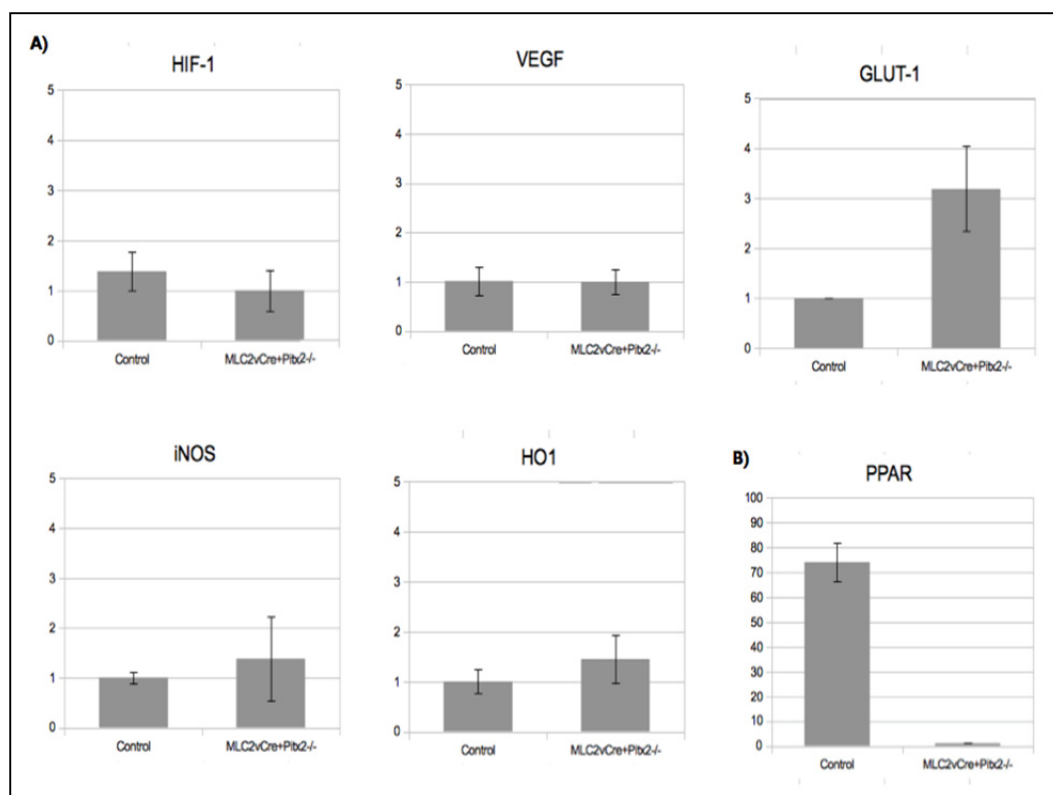


Figure 4. A) qRT-PCR analysis of HIF-1 α , VEGF, HO-1, iNOS, GLUT-1 mRNA expression in wild-type and MLC2vCrePitx2^{-/-} ventricles. B) qRT-PCR analysis PPAR- α mRNA expression in wild-type and MLC2vCrePitx2^{-/-} ventricles

disease (Allard, 2004; Cokkinos & Pantos, 2011; Kitakaze et al. 1999).

Down-stream studies

Because changes in different metabolic pathways has been previously associated to cardiac hypertrophy as well as to myocardial ischemia (Abozguia et al. 2009; Tsutsui et al. 2009), and vascular remodelling are commonly associated with both process (Tabibiazar & Rockson, 2001), we studied the morphology of the vascular niche in adult Mlc2vCrePitx2^{-/-} and wild type. As expected, there was an increase in the ventricle capillary density in the IVS and LV. And this increase was developed as post-natal event rather than/instead of during cardiac development. This post-birth vessels growth is commonly observed in hypertrophic hearts (Tabibiazar & Rockson, 2001). As commented above, the increase in the number of the capillaries where in the ventricular regions that display a hypertrophic phenotype (IVS and LV), indicating that vessels increase may be secondary to the hypertrophic process.

It is well know that in pathological conditions as cardiac hypertrophy or cardiac ischemia, metabolism pathways of the heart are altered leading to a reduction on fatty acid oxidation rate and a increment in the rate of glucose oxidation (Allard et al. 1994; Shohet & Garcia, 2007). Our proteomics analysis indicated that glycolysis pathway could be altered in MLC2vCrePitx2^{-/-} hearts, therefore we check possible changes in the glucose uptake in the transgenic hearts, by analysing the expression of Glut-1 mRNA by RT-PCR. Because to Glut-1 is also a target of HIF-1 α , we study the hypoxia-inducible factor 1 pathway to investigate if ischemic insults are present in MLC2vCrePitx2^{-/-} hearts. The result of this experiment show that Glut-1 mRNA was up-regulated in MLC2vCrePitx2^{-/-} hearts, but no ischemic insults were present in these hearts, because no difference in the hypoxia-inducible pathway expression genes between transgenic and wild type mice were found. Showing that MLC2vCrePitx2^{-/-} hearts have several metabolism pathways altered, an

increment in the ventricle capillary density and a shift in energy metabolism with a glucose uptake increased, we explore the importance of this shift in the energy balance by determining the expression of the Ppara mRNA, an enzyme which plays a critical role on the maintenance of cardiac energy (Madrazo & Kelly, 2008), Ppara mRNA was down-regulated demonstrating that Mlc2vCrePitx2^{-/-} null mutants displays a molecular cardiac remodelling in energy metabolism.

REFERENCES

- Abozguia K, Shivu GN, Ahmed I, Phan TT, Frenneaux MP. The heart metabolism: pathophysiological aspects in ischaemia and heart failure. *Curr Pharm Des*. 2009. 15:827-835.
- Allard MF. Energy substrate metabolism in cardiac hypertrophy. *Curr Hypertens Rep*. 2004. 6:430-435.
- Burdine RD, Schier AF. Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation. *Genes Dev*. 2000. 14:763-776.
- Campione M, Ros MA, Icardo JM, Piedra E, Christoffels VM, Schweickert A, Blum M, Franco D, Moorman AF. Pitx2 expression defines a left cardiac lineage of cells: evidence for atrial and ventricular molecular isomerism in the iv/iv mice. *Dev Biol*. 2001. 231:252-264.
- Chinchilla A, Daimi H, Lozano-Velasco E, Dominguez JN, Caballero R, Delpón E, Tamargo J, Cincica J, Hove-Madsen L, Aránega AE, Franco D. PITX2 insufficiency leads to atrial electrical and structural remodeling linked to arrhythmogenesis. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011. 4: 269-279.
- Cokkinos DV, Pantos C. Myocardial remodeling, an overview. *Heart Fail Rev*. 2011. 16:1-4.
- De La Fuente M, Borrajo A, Bermúdez J, Lores M, Alonso J, López M, Santalla M, De Ron AM, Zapata C, Alvarez G. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *J Proteomics*. 2011. 74:262-267.
- de Lange FJ, Moorman AF, Christoffels VM. Atrial cardiomyocyte-specific expression of Cre recombinase driven by an Nppa gene fragment. *Genesis*. 2003. 37:1-4.
- Dominguez JN, de la Rosa A, Navarro F, Franco D, Aránega AE. Tissue distribution and subcellular localization of the cardiac sodium channel during mouse heart development. *Cardiovasc Res*. 2008. 78 :45-52.
- Dominguez JN, Navarro F, Franco D, Thompson RP, Aránega AE. Temporal and spatial expression pattern of beta1 sodium channel subunit during heart development. *Cardiovasc Res*. 2005. 65:842-850.
- Gage PJ, Suh H, Camper SA. Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development*. 1999. 126:4643-4651.
- Görg A, Boguth G, Obermaier C, Posch A, Weiss W. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis*. 1995.16:1079-86.
- Gudbjartsson DF, Amar DO, Helgadóttir A, Gretarsdóttir S, Holm H, Sigurdsson A, Jonasdóttir A, Baker A, Thorleifsson G, Kristjansson K, Pálsson A, Blondal T, Sulem P, Backman VM, Hardarson GA, Palsdóttir E, Helgason A, Sigurjonsdóttir R, Sverrisson JT, Kostulas K, Ng MC, Baum L, So WY, Wong KS, Chan JC, Furie KL, Greenberg SM, Sale M, Kelly P, MacRae CA, Smith EE, Rosand J, Hillert J, Ma RC, Ellinor PT, Thorgeirsson G, Gulcher JR, Kong A, Thorsteinsdóttir U, Stefansson K. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nature*. 2007. 448:353-357.
- Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993. 90:5011-5015.
- Kääb S, Darbar D, van Noord C, Dupuis J, Pfeufer A, Newton-Cheh C, Schnabel R, Makino S, Sinner MF, Kannankeril PJ, Beckmann BM, Choudry S, Donahue BS, Heeringa J, Perz S, Lunetta KL, Larson MG, Levy D, MacRae CA, Ruskin JN, Wacker A, Schömig A, Wichmann HE, Steinbeck G, Meitinger T, Uitterlinden AG, Witteman JC, Roden DM, Benjamin EJ, Ellinor PT. Large scale replication and meta-analysis of variants on chromosome 4q25 associated with atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2009. 30:813-819.
- Kirchhof P, Kahr PC, Kaese S, Piccini I, Vokshi I, Scheld HH, Rotering H, Fortmueller L, Laakmann S, Verheule S, Schotten U, Fabritz L, Brown NA. PITX2c is expressed in the adult left atrium, and reducing Pitx2c expression promotes atrial fibrillation inducibility and complex changes in gene expression. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011. 4:123-133.
- Kitakaze M, Minamino T, Node K, Takashima S, Funaya H, Kuzuya T, Hori M. Adenosine and cardioprotection in the diseased heart. *Jpn Circ J*. 1999. 63:231-243.
- Kitakaze M, Minamino T, Node K, Takashima S, Funaya H, Kuzuya T, Hori M. Adenosine and cardioprotection in the diseased heart. *Jpn Circ J*. 1999. 63:231-243.
- Kitamura K, Miura H, Miyagawa-Tomita S, Yanazawa M, Katoh-Fukui Y, Suzuki R, Ohuchi H,

- Suehiro A, Motegi Y, Nakahara Y, Kondo S, Yokoyama M. Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and pericardial mesoderm and right pulmonary isomerism. *Development*. 1999. 126:5749-5758.
- Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 96:7473-7478.
- Liu C, Liu W, Lu MF, Brown NA, Martin JF. Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity. *Development*. 2001. 128: 2039-2048.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001. 25:402-408.
- Lubitz SA, Sinner MF, Lunetta KL, Makino S, Pfeufer A, Rahman R, Veltman CE, Barnard J, Bis JC, Danik SP, Sonni A, Shea MA, Del Monte F, Perz S, Müller M, Peters A, Greenberg SM, Furie KL, van Noord C, Boerwinkle E, Stricker BH, Witteman J, Smith JD, Chung MK, Heckbert SR, Benjamin EJ, Rosand J, Arking DE, Alonso A, Kääb S, Ellinor PT. Independent susceptibility markers for atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Circulation*. 2010. 122:976-84.
- Luttun A, Carmeliet P. De novo vasculogenesis in the heart. *Cardiovasc Res*. 2003. 58:378-389.
- Madrazo JA, Kelly DP. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2008. 44:968-975.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 1988. 9:255-262.
- Schweickert A, Campione M, Steinbeisser H, Blum M. Pitx2 isoforms: involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry. *Mech Dev*. 2000. 90: 41-51.
- Shohet RV, Garcia JA. Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia. *J Mol Med (Berl)*. 2007. 85:1309-1315.
- Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*. 2005. 85:1093-1129.
- Tabibiazar R, Rockson SG. Angiogenesis and the ischaemic heart. *Eur Heart J*. 2001. 22:903-918.
- Tessari A, Pietrobon M, Notti A, Cifelli G, Gage PJ, Schneider MD, Lembo G, Campione M. Myocardial Pitx2 differentially regulates the left atrial identity and ventricular asymmetric remodeling programs. *Circ Res*. 2008. 102:813-822.
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. *Cardiovasc Res*. 2009. 81:449-456.
- Wang J, Klysik E, Sood S, Johnson RL, Wehrens XH, Martin JF. Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. 107:9753-9758.

Appendix 1

Table 1. Sequence of each primer used for the RT-PCR.

Gen	Primer Sequence (5' to 3')		Product size	Ta / °C
hif-1 α	Forward	CCTGGAAACGAGTGAAAGGA	175 bp	60°C
	Reverse	CTGCCTTGTATGGGAGCATT		
ho-1	Forward	CCCCAGATCAGCACTAGCTC	156 bp	60°C
	Reverse	AGAGAGAAGGCCACATTGGA		
iNos	Forward	AGGTGCACACAGGCTACTCC	181 bp	60°C
	Reverse	GCCACCAGCTTCTTCAATGT		
Glut-1	Forward	GTCCTGCTGCTATTGCTGTG	196 bp	60°C
	Reverse	GAAGCGATCTCATCGAAGGT		
vegf	Forward	CAAGATCCGCAGACGTGTAA	180 bp	60°C
	Reverse	TTAATCGGTCTTTCGGTGA		
Ppar α	Forward	AGGAAGCCGTTCTGTGACAT	243 bp	60°C
	Reverse	TTGAAGGAGCTTTGGGAAGA		



DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

Aunque las técnicas que han sido el pilar fundamental del desarrollo de la proteómica comenzaron a utilizarse décadas atrás (1975-1990), no ha sido hasta esta última década (2000-2010) cuando se ha producido la explosión de la proteómica como el conjunto de técnicas y herramientas utilizadas para el estudio sistemático y a gran escala de las proteínas que hoy conocemos. Dentro de la proteómica e incluyendo los grandes avances que se han producido en los últimos años, la electroforesis bidimensional de alta resolución sigue siendo uno de los pilares fundamentales dentro de este campo gracias a su versatilidad, capacidad resolutive y facilidad en la cuantificación de la expresión de las proteínas, entre otros aspectos.

En la denominada era post-genómica, el estudio del proteoma está considerado como el siguiente paso necesario para la comprensión de los sistemas biológicos. Como se mencionó en la introducción, el estudio del proteoma es a priori mucho más complejo que el estudio del genoma, ya que el genoma es más o menos estático, mientras que el proteoma es mucho más dinámico, difiriendo entre células de un mismo organismo, entre estados fisiológicos, y además es mucho más modificable si se tienen en cuenta las posibles modificaciones post-traduccionales de las proteínas.

Los estudios proteómicos al permitir el estudio masivo de la expresión de las proteínas tienen la peculiaridad de que no es necesario sugerir o tener una hipótesis previa para plantear o llevar a cabo los estudios deseados. En función de esta propiedad se han realizado las dos revisiones en el campo de la medicina y se han realizado los tres estudios planteados en esta memoria.

En el **Capítulo 1** de la presente Tesis se mostró como la proteómica puede tener un papel relevante en el entendimiento de las enfermedades complejas.

Durante este capítulo se expusieron una gran cantidad de exitosos ejemplos sobre el descubrimiento de nuevas proteínas que podrían estar implicadas en diversas enfermedades, y que seguramente, serían difíciles de descubrir mediante otras vías. Se revisaron estudios sobre búsqueda de nuevos marcadores de enfermedades a partir de la obtención no invasiva de muestras como la obtención de plasma/suero y orina e incluso del fluido cerebroespinal, y por otro lado, aproximaciones proteómicas para el estudio de las enfermedades en los tejidos afectados por las enfermedades de forma directa. En este apartado se revisaron enfermedades de alta incidencia y de alta importancia en la población como son el cáncer de pulmón (primera causa de muerte por cáncer en el mundo debido la dificultad de diagnóstico en los estadíos tempranos), las enfermedades cardiovasculares (la causa más común de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados) (Bermudez-Crespo & López, 2007b). También se repasaron aunque en menos detalle los resultados de la obtención de posibles marcadores de diversos tipos de cáncer como el cáncer de ovario, de próstata o hígado (Bermudez-Crespo & López, 2007a). Finalmente se realizó también una revisión sobre las posibilidades que ofrece la proteómica en el descubrimiento de nuevos fármacos (Bermudez-Crespo & López, 2007a,b).

En los siguientes capítulos se han descrito tres estudios utilizando la electroforesis bidimensional como herramienta principal en el estudio. Los estudios se realizaron en tres grupos taxonómicos pertenecientes a diferentes reinos (ratones, bacterias y musgos) y con objetivos finales completamente dispares, aunque los estudios estuvieron siempre centrados en la obtención de las proteínas que tenían una expresión diferente entre las muestras estudiadas.

Como se ha mencionado anteriormente en la revisión de Bermúdez-Crespo & López (2007a) (**Capítulo 1**), uno de los pasos más importantes para obtener resultados consistentes y reproducibles en la electroforesis bidimensional es la extracción de las proteínas de la muestra. Este paso marca la diferencia entre obtener geles bidimensionales definidos y reproducibles y geles bidimensionales imposibles de estudiar debido a su mala calidad. Debido a ello, existen diferentes protocolos de extracción de proteínas que son usados en función del

origen y complejidad de la muestra (Link, 1999; Shaw & Rieder, 2003; Cañas *et al.*, 2007). Debido a la amplia experiencia acumulada en el Departamento de Xenética de la Universidad de Santiago de Compostela en la utilización de la electroforesis bidimensional, se ha empleado un protocolo de extracción de proteínas común en todos los estudios, ya que siempre dio buenos resultados. La parte más importante de este protocolo de extracción es el buffer de extracción de proteínas, el tiempo de extracción y la temperatura durante el proceso. El buffer de extracción utilizado está compuesto por 7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 0.6 % DTT, 1% IPG buffer 4-7 y trazas de bromofenol. La urea y tiourea rompen los puentes de hidrógeno de las proteínas llevando a las proteínas a desplegarse y desnaturalizarse, el CHAPS funciona como detergente permitiendo la solubilización de las proteínas, el DTT rompe los puentes disulfuro y el IPG Buffer 4-7 contiene anfóteros que ayudan a la focalización de las proteínas durante el transcurso de la primera dimensión, y el azul de bromofenol se utiliza para poder seguir el proceso de la focalización de las proteínas durante la primera dimensión. Existen otros buffers de extracción que contienen menos urea (5M) o no contienen Tiourea (aumentando la concentración de Urea a 9-8M), o sustituyen el CHAPS por otros detergentes como el SB 3-10 o el ASB 14 (De Marqui *et al.*, 2005). Además existen buffers de extracción específicos diseñados para plantas (Thiellement *et al.*, 2007), pero que en este caso durante el proceso de optimización no dieron mejores resultados que el buffer finalmente utilizado.

En la electroforesis bidimensional propiamente dicha, se eligió para los tres estudios un pH de estudio de 4-7. Esta elección de pH resultó ser acertada ya que se obtuvieron geles bidimensional con una gran número de proteínas y muy bien focalizados, lo que facilitó su posterior análisis mediante el Software PDQuest. La razón fundamental de esta elección y no utilizar un pH más amplio como 3-10 ó 3-11 es bien conocida dentro del campo de la electroforesis bidimensional y es la dificultad de separar y focalizar las proteínas de punto isoelectrico elevado (proteínas básicas) debido a la migración del DTT hacia pH más ácidos durante el isoelectroenfoco lo que provoca el restablecimiento de los puentes disulfuros provocando una mala focalización de las proteínas (*Streaking*) (Dépagné & Chevalier, 2012).

Otro punto destacable fue la elección de la longitud (anchura de los geles). En estos momentos existen 4 tipos de anchura de geles, la cual viene determinada por la longitud de las tiras de IPG utilizadas durante el isoelectroenfoco. Los tamaños son los siguientes: 7 cm, 11-13 cm, 17-18 cm y 24 cm. En dos de los trabajos aquí expuestos (el estudio de los corazones de ratón y el estudio de las diferentes cepas de *Vibrio tapetis*) se ha utilizado el tamaño más grande existente de forma comercial (24 cm) mientras en el estudio de la adaptación del musgo a la contaminación se utilizaron IPGs de 11 cm. La elección de la longitud de 11 cm se debió a la enorme cantidad de geles que requería este estudio (100 geles aproximadamente) por lo que realizarlo en geles de 24 cm sería mucho más costoso en tiempo y dinero. En los tres estudios se consiguieron spots bien definidos y bien separados que fueron perfectamente identificables, cuantificables y analizables por el software PDQuest, no encontrándose grandes problemas de solapamiento entre spots, el cual es otro de los grandes problemas a solventar en el manejo de la electroforesis bidimensional (Corthals *et al.*, 2000).

La elección del tipo de tinción es otro aspecto importante dentro de la electroforesis bidimensional sea cual sea la muestra a estudiar. Existen varios tipos de tinciones, todos estandarizados. Los métodos más usados para la tinción de las proteínas son: la tinción de plata (Nesterenko *et al.*, 1994), Coomassie –blue (Neuhoff *et al.*, 1988) y compuestos fluorescentes (Patton, 2000). La tinción de plata está considerada como la tinción más sensible pero no es un método cuantitativo (Shevchenko *et al.*, 1996). Por el contrario, la tinción con Coomassie es un método cuantitativo y cualitativo, aunque su sensibilidad es menor que la de la tinción plata. Debido a las limitaciones de la tinción de Coomassie, en términos de sensibilidad, y las complicaciones derivadas de la tinción de plata en términos de baja reproducibilidad e incompatibilidad con el método de identificación proteica, se han desarrollado tinciones basadas en compuestos fluorescentes (Patton, 2000). En el desarrollo de los estudios aquí incluidos se han utilizado una tinción de Coomassie con ligeras modificaciones que producen un gran aumento de su sensibilidad para los estudios de geles de 24 cm (ratones y bacterias) mientras que se ha utilizado la tinción fluorescente comercial Sypro Ruby para los geles pequeños de 11 cm (musgos). De nuevo en este caso, las dos tincio-

nes utilizadas dieron un resultado satisfactorio ya que en todos los estudios pudieron detectarse y analizarse un elevado número de proteínas, más de 200 en todos los casos. Claramente, la tinción de fluorescencia es superior en sensibilidad y seguramente en los estudios en lo que se utilizó la tinción de Coomassie se hubiesen visualizado más proteínas, pero debido en la época que se realizaron los estudios, la tecnología disponible y el coste económico de la tinción hacían inviable su uso.

El análisis informático de los geles se llevo acabo utilizando el software PDQuest V8.0. En todos los estudios se optó por un análisis automático en primera instancia tras el cual se realizaba una concienzuda edición manual para conseguir un perfil de spots consistente entre todos los geles. Las reproducibilidades de todos los geles en cada uno de los estudios llegó a tener un valor de $R^2 \geq 0,90$ lo que implica una gran reproducibilidad de los geles. Una elevada reproducibilidad es imprescindible para obtener resultados consistentes y verdaderos en la diferencias de expresión de las proteínas encontradas entre las muestras analizadas.

En el estudio descrito en el **Capítulo 2** se utilizó la electroforesis bidimensional para estudiar las similitudes y diferencias entre los proteomas de dos cepas de *Vibrio tapetis*. En este estudio no se realizó ningún análisis estadístico ya que el enfoque del estudio era de tipo descriptivo. En este estudio se realizó un mapa proteómico de referencia de la principal cepa de *Vibrio tapetis* (CECT 4600T), y este mapa se comparó con el proteoma de la cepa de *V. tapetis* más próxima filogenéticamente pero con claras diferencias a nivel fenotípico, antigénico y genético. En los dos proteomas analizados se obtuvieron más de 400 proteínas. Estos resultados se ajustan a los obtenidos en otros estudios de mapas de referencia como el de *Vibrio cholerae* El Tor (Coelho *et al.*, 2004).

El análisis visual y global de los proteomas de las dos cepas evidenció que aunque existen unas diferencias claras a nivel genético y a nivel fisiopatológico entre las dos cepas estudias (Rodríguez *et al.*, 2006), éstas tienen un patrón expresión proteico bastante similar para las proteínas ácidas de elevado peso

molecular, mientras que la similitud del patrón de expresión de las proteínas de bajo peso molecular no está tan claro.

A nivel más específico de proteínas individuales, el programa de análisis de geles bidimensionales (PDQuest software v8.0), detectó 56 proteínas cuya posición era similar en los geles de las cepas. Estas 56 proteínas y 27 proteínas más (escogidas para tener una mayor conocimiento de los proteomas) fueron analizadas por MS o MS/MS. De las 56 proteínas cuya posición era similar en los geles de las dos cepas, 45 de ellas también coincidieron en identidad, mientras sólo tres de ellas diferían en la identidad pero no en posición. Las 8 proteínas restantes no pudieron ser analizadas entre las cepas debido a la ausencia de identificación de las proteínas, en una o las dos cepas. De las 20 proteínas más abundantes identificadas en la cepa CECT 4600T (cepa principal del estudio), 18 de ellas también fueron identificadas en la cepa GR0202RD. Este hecho sugiere que estas proteínas tienen un papel esencial para el buen funcionamiento y supervivencia de cualquier cepa de *V. tapetis*.

El hallazgo más relevante fue que la proteína más abundante encontrada en los proteomas de las dos cepas (spots 37 y spot 104) se identificó como una porina OmpH. Estas dos proteínas se encontraban en posiciones diferentes a nivel de punto isoelectrico, siendo la posición del spot 104 (cepa 0202) algo más ácida. Este hecho, sumado a que el peso molecular de las dos proteínas es muy parecido, indica que las proteínas difieren en la secuencia aminoacídica en un porcentaje tal, que es capaz de causar una diferencia de la movilidad de estas proteínas en el punto isoelectrico. Este descubrimiento, unido a la capacidad antigénica e inmunogénica de estas proteínas hace que sean una candidatas ideales para ahondar en el estudio de las diferencias fisiopatológicas encontradas entre estas dos cepas. Además se pudo comprobar que el patrón proteico de las dos cepas tiende a ser muy ácido, corroborando así la hipótesis y las investigaciones de Kiraga *et al.*, quienes postulan que la distribución de los proteomas de los organismos procariotas están fuertemente relacionados por la relación microorganismo-hospedador, el hábitat y la salinidad del ambiente, pero

no está relacionado con los requisitos de oxígeno ni de temperatura (Kiraga *et al.*, 2007).

En el estudio incluido en el **Capítulo 3** se indagó sobre la existencia o no de un proceso de adaptación fisiológica del musgo (*Pseudoscleropodium purum*) a la contaminación atmosférica por metales pesados. Este estudio tiene especial relevancia debido al papel de biomonitor ambiental que tiene el musgo. Para ello se seleccionaron musgos en dos entornos industriales con una elevada contaminación atmosférica (Fernández *et al.*, 2007) y se trasplantaron estas muestras de musgos a un entorno de baja/nula contaminación atmosférica. También se realizaron también trasplantes de la zona limpia a las zonas contaminadas. Por otro lado, también se realizaron autotransplantes de cada zona, para evitar que las diferencias encontradas entre los grupos pudiesen ser debidas a la manipulación y transporte de las muestras.

Debido a la gran complejidad del estudio y largo tiempo de duración, primero se compararon los proteomas de los tiempos cero de las musgos de la zona limpia frente a los proteomas de los musgos de las dos zonas contaminadas. En este experimento se encontraron 17 proteínas que presentan una diferencia de expresión entre la zona limpia y las zonas contaminadas estadísticamente significativa (t-test $p < 0.05$).

En el segundo experimento se evaluó si estas diferencias encontradas entre los tiempos cero se mantenían a lo largo del tiempo a los 60 días y a los 480 días. A los 480 días, se pudieron identificar 5 proteínas que seguían manteniendo la diferencia de expresión entre los trasplantes de la muestras de zona limpia a la zona contaminada y viceversa (muestras trasplantadas de la zona sucia a la zona limpia), lo cual muestra que el proteoma del musgo si se modifica cuando las condiciones ambientales cambian. De esta forma cuando el musgo pasa de la una zona contaminada a la zona limpia las proteínas que estaban sobre expresadas tienden a expresarse menos (igualándose a la expresión de los autotransplantes de la zona limpia) y viceversa. Lo mismo ocurre cuando los musgos son trasladados de la zona limpia a las zonas sucias. De las 5 proteínas donde

se ha observado este fenómeno de adaptación, dos proteínas pudieron ser identificadas mediante MS (Ver **Capítulo 3**).

Es importante destacar que como parte del proyecto para conocer la capacidad de adaptación del musgo al ambiente, se realizó, en paralelo al proteómico, un estudio cuya finalidad fue la de determinar en las mismas muestras de musgos (trasplantados y autotrasplantados), las concentraciones de varios metales pesados presentes en el ambiente (Boquete *et al.*, 2013). En este estudio se observó que los cambios encontrados en la expresión global de las proteínas también ocurrían con las concentraciones de los metales pesados estudiados (Cd, Cu, Hg, Pb y Zn). De esta forma los trasplantes que se habían realizado de la zona limpia a la zona contaminada llegaron a acumular una concentración de metales pesados mayor que los autotransplantes de la zona contaminada en las mismas fechas, sugiriendo que los musgos de las zonas contaminadas han desarrollado algún tipo de mecanismo en la toma y expulsión de metales pesados (reduciendo la primera ó aumentando la segunda) que les permiten evitar la elevada toxicidad generada por estos contaminantes.

Desafortunadamente, no hemos conseguido relacionar los cambios producidos en los mecanismos de detoxificación del musgo y los cambios producidos en el proteoma de los musgos. Aunque sí se han observado cambios en el patrón global de expresión de las proteínas, estos cambios están relacionados con el metabolismo celular, los cuales no pueden ser explicados por los cambios en las concentraciones de metales pesados en el interior del musgo. Por lo tanto, las modificaciones reversibles en la expresión de las proteínas identificadas en este trabajo pueden deberse a otros tipos de estrés, ya que las plantas pueden desarrollar respuestas inespecíficas a más de un factor (Agrawal & Rakwal, 2006).

En el estudio descrito en el **Capítulo 4** se utilizó la electroforesis bidimensional como una vía de entrada para conocer las consecuencias que se producen durante el desarrollo cardíaco al inhibir parcialmente la expresión del factor de transcripción Pitx2, el cual que tiene un papel muy importante durante la morfogénesis cardíaca. Para realizar este estudio se generaron ratones Pitx2 nulos

condicionales ventrículo-específicos (ratones *Mlc2vCrePitx2^{-/-}*) y el proteoma de estos ventrículos fue comparado con el proteoma de ventrículos de ratones control. En este estudio se obtuvieron 22 proteínas de interés, de las cuales 17 pudieron ser identificadas de forma inambigua por MS.

La identificación de estas proteínas, y el conocimiento de las vías celulares en las que están implicadas dichas proteínas sugerían que en los corazones de los ratones *Mlc2vCrePitx2^{-/-}* había ocurrido un fenómeno denominado remodelación miocárdica, el cual ocurre como consecuencia de una disfunción cardíaca (Abozgui *et al.*, 2009; Tsutsui *et al.*, 2009). Esta hipótesis sobre lo que estaba sucediendo o había sucedido en los corazones de los ratones *Mlc2vCrePitx2^{-/-}* fue posteriormente estudiada mediante otras aproximaciones independientes de la electroforesis bidimensional.

Para seguir estudiando hasta que punto el proceso de remodelación cardíaca se estaba produciendo en los corazones *Mlc2vCrePitx2^{-/-}*, decidimos estudiar varias de las posibles vías alteradas desde diferentes perspectivas. Así, basándonos en la estrecha relación existente entre los procesos hipertróficos y los eventos isquémicos, y la remodelación de la red vascular asociada a ambos procesos (Tabibiazar & Rockson, 2001; Maron *et al.*, 2009), estudiamos la densidad de la red capilar existente en los ventrículos de los corazones *Mlc2vCrePitx2^{-/-}* respecto a los ventrículos de los corazones control. Los resultados indicaron que tanto el ventrículo izquierdo como el tabique interventricular tiene una mayor vascularización que las mismas zonas en los corazones control, y que este aumento de la red vascular se debe a procesos angiogénicos post-nacimiento y no antes de éste, ya que no existen diferencias significativas en el número de capilares en el estadio fetal E18.5, entre los corazones *Mlc2vCrePitx2^{-/-}* y los corazones control.

Las alteraciones en la expresión de varias proteínas relacionadas con las vías metabólicas y la obtención de energía cobran una gran relevancia en el contexto estudiado ya que bajo condiciones no isquémicas casi todo (> 95%) el ATP producido se genera a través de la fosforilación oxidativa en la mitocondria y con una pequeña aportación derivada de la glucólisis y del GTP producido en el ciclo

de Krebs. Además, en condiciones normales de aporte de oxígeno, entre el 60-90 % de la acetil-CoA utilizado en el ciclo de Krebs deriva de la oxidación de los ácidos grasos mediante la β -oxidación, mientras que solo el 10-40 % proviene de la glucolisis y oxidación de la glucosa (Abozguia *et al.*, 2009; Stanley *et al.*, 2005). Por ello, estudiamos a nivel de ARN mensajero la expresión de dos proteínas clave en el metabolismo de los carbohidratos y de los ácidos grasos, el transportador de glucosa no dependiente de insulina (GLUT-1) y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR α) que juegan un papel regulador en la expresión de genes de la síntesis y de la oxidación de ácidos grasos (Barger *et al.*, 2000). La elección de estudiar estas dos proteínas fue debido a que GLUT-1 tiene una expresión muy elevada en los estadios fetales, ya que durante el desarrollo fetal la glucosa es el principal sustrato energético del feto. Por ello, además de conocer la expresión de GLUT-1 en los corazones adultos, y de forma indirecta la demanda de glucosa por el corazón, también nos daría pistas sobre si la reactivación de la maquinaria de genes fetales que se produce, como ya se ha mencionado anteriormente, durante la remodelación cardíaca está ocurriendo en los corazones Mlc2vCrePitx2 $^{-/-}$. PPAR α juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis lipídica mediante la regulación de la expresión de los genes implicados en la β -oxidación, y porque además se ha observado que su expresión disminuye en procesos hipertróficos (Barger *et al.*, 2000). La expresión GLUT-1 a nivel de ARN mensajero resultó estar aumentada en los corazones Mlc2vCrePitx2 $^{-/-}$ respecto a los corazones control, mientras que la expresión de PPAR α a nivel mensajero resultó estar disminuida de una forma drástica en estos mismos corazones. Estos resultados sugieren que en los corazones Mlc2vCrePitx2 $^{-/-}$ se ha producido un cambio en la preferencia de utilización del sustrato para la obtención de energía, pasando de utilizar la oxidación de los ácidos grasos a utilizar la oxidación de la glucosa como vía principal para la obtención de ATP.



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

La aportación principal de este trabajo ha sido el diseño e implementación de una metodología común para el estudio del proteoma de cualquier organismo mediante la electroforesis bidimensional de una forma precisa, reproducible y eficaz, desde la recepción de las muestras hasta su análisis posterior mediante un software específico para dicho fin.

Este objetivo se ha llevado a cabo satisfactoriamente mediante la puesta en aplicación de la electroforesis bidimensional para el estudio del proteoma en diversos grupos taxonómicos: Bacteria (*Vibrio tapetis*), Briofitos (*Pseudoscleropodium purum*) y Mamíferos (*Mus musculus*) utilizando un buffer de extracción de proteínas común para todos los estudios, demostrando así la versatilidad de esta técnica para el estudio masivo de proteínas de cualquier organismo.

Las conclusiones que se derivan de este trabajo de investigación se presentan a continuación y están relacionadas con los objetivos secundarios presentados al comienzo de la tesis:

1. Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se ha conseguido elaborar el primer mapa proteómico de referencia de la cepa más relevante de *Vibrio tapetis* (CECT 4600T), microorganismo de gran relevancia en el cultivo de almejas debido a que es el causante de la enfermedad del Anillo Marrón. Además también se ha conseguido definir el mapa proteómico de la cepa de *V. tapetis* más próxima filogenéticamente a la cepa CECT 4600T, pudiéndose comparar las dos cepas a nivel proteómico de una forma rápida, precisa y fiable, obteniéndose resultados sobre similitudes y diferencias en la expresión global de proteínas entre estas cepas, que de otra forma serían mucho más costosos y difíciles de conseguir.

2. En el estudio referente a la adaptación fisiológica del musgo a la contaminación atmosférica, gracias a la utilización de la electroforesis bidimensional como herramienta de análisis, se ha conseguido observar que la contaminación atmosférica es capaz de modular el patrón de expresión global de las proteínas en el musgo, demostrando la existencia de procesos fisiológicos adaptativos de éste a la contaminación ambiental. Desafortunadamente en este estudio no se han llegado a identificar las proteínas implicadas directamente en este proceso de adaptación y por ello serían necesarios nuevos estudios para conocer en más detalles cuales son los actores (proteínas) principales implicadas este proceso.
3. En el estudio en el que se utilizó la electroforesis bidimensional como vía de entrada para conocer las consecuencias de la inhibición parcial del factor de transcripción Pitx2 durante el desarrollo cardiaco, se consiguió, sin tener ninguna información previa al estudio, detectar que estos corazones había sufrido el proceso denominado remodelación cardiaca donde el metabolismo del corazón estaba alterado. A partir de este descubrimiento, se observó que el ventrículo izquierdo y el tabique interventricular de estos corazones tenían una mayor vascularización que los corazones control, y que este aumento de la vascularización se producía después del nacimiento. Todos estos resultados evidencian que la inhibición parcial del factor de transcripción conlleva cambios en el corazón que se traducen en una remodelación del metabolismo cardiaco pasando de utilizar la oxidación de ácidos grasos a utilizar la oxidación de la glucosa como vía principal para la obtención de ATP.



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Abdi F, Quinn JF, Jankovic J, McIntosh M, Leverenz JB, Peskind E, Nixon R, Nutt J, Chung K, Zabetian C, Samii A, Lin M, Hattan S, Pan C, Wang Y, Jin J, Zhu D, Li GJ, Liu Y, Waichunas D, Montine TJ, Zhang J. Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis*. 2006. 9:293-348.
- Abozguia K, Shivu GN, Ahmed I, Phan TT, Frenneaux MP. The heart metabolism: pathophysiological aspects in ischaemia and heart failure. *Curr Pharm Des*. 2009. 15:827-835.
- Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL Jr. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res*. 2002. 62:3609-3614.
- Agaton C, Uhlén M, Hober S. Genome-based proteomics. *Electrophoresis*. 2004. 25:1280-1288.
- Agrawal, GK., Rakwal, R. Rice proteomics: a cornerstone for cereal food crop proteomes. *Mass Spectrometry Reviews*. 2006. 25:1-53.
- Ahmed N, Barker G, Oliva K, Garfin D, Talmadge K, Georgiou H, Quinn M, Rice G. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum. *Proteomics*. 2003. 3:1980-1987.
- Alaiya AA, Franzén B, Fujioka K, Moberger B, Schedvins K, Silfversvärd C, Linder S, Auer G. Phenotypic analysis of ovarian carcinoma: polypeptide expression in benign, borderline and malignant tumors. *Int J Cancer*. 1997. 73:678-683.
- Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics*. 2003. 3:36-44.

- Albrecht D, Kniemeyer O, Brakhage AA, Guthke R. Missing values in gel-based proteomics. *Proteomics*. 2010. 10(6). 1202-1211.
- Allam B, Ashton-Alcox K, Ford SE. Hemocyte activities associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Dev Comp Immunol*. 2001. 25:365-375.
- Allam B, Ford SE. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species. I. Haemocyte changes following in vitro challenge. *Fish Shellfish Immunol*. 2006. 20:374-383.
- Allam B, Paillard C, Ford SE. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of Brown Ring Disease (BRD) in clams. *Dis Aquat Org*. 2002. 48:221-231.
- Allard MF. Energy substrate metabolism in cardiac hypertrophy. *Curr Hypertens Rep*. 2004. 6:430-435.
- Altland K, Becher P, Rossmann U, Bjellqvist B. Isoelectric focusing of basic proteins: the problem of oxidation of cysteines. *Electrophoresis*. 1988. 9:474-485.
- Altschul SF, Madden TL, Shäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997. 25:3389-3402.
- An HJ, Kim DS, Park YK, Kim SK, Choi YP, Kang S, Ding B, Cho NH. Comparative proteomics of ovarian epithelial tumors. *J Proteome Res*. 2006. 5:1082-1090.
- Anderson L, Anderson NG. High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977. 74:5421-5425.
- Anderson L, Anderson NG. Microheterogeneity of serum transferrin, haptoglobin and alpha 2 HS glycoprotein examined by high resolution two-dimensional electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1979. 88: 258-265.
- Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*. 1997. 18:533-537.
- Anderson L. Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J Physiol*. 2005. 563:23-60.
- Anderson NG, Anderson L. The Human Protein Index. *Clin Chem*. 1982. 28:739-48.

- Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002. 1:845-867.
- Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, Veenstra TD, Adkins JN, Pounds JG, Fagan R, Lobley A. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics*. 2004. 3:311-326.
- Ang IL, Poon TC, Lai PB, Chan AT, Ngai SM, Hui AY, Johnson PJ, Sung JJ. Study of serum haptoglobin and its glycoforms in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a glycoproteomic approach. *J Proteome Res*. 2006. 5:2691-2700.
- Antonarakis SE. 2010. Human Genome Sequence and Variation. En: Vogel and Motulsky's Human Genetics, de MR Speicher, SE Antonrakis y AG Motulsky (editores). Springer-Verlag, Berlin
- Arenkov P, Kukhtin A, Gemmell A, Voloshchuk S, Chupeeva V, Mirzabekov A. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal Biochem*. 2000. 278:123-131.
- Balboa S, Bermudez-Crespo J, Gianzo C, López JL, Romalde JL. Proteomics and multilocus sequence analysis confirm intraspecific variability of *Vibrio tapetis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2011. 324:80-87.
- Bandara LR, Kelly MD, Lock EA, Kennedy S. A potential biomarker of kidney damage identified by proteomics: preliminary findings. *Biomarkers*. 2003. 8:272-286.
- Bandara LR, Kennedy S. Toxicoproteomics -- a new preclinical tool. *Drug Discov Today*. 2002. 7:411-418.
- Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W, Pappin DJ, Selby PJ. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet*. 2000. 356:1749-1756.
- Bañez LL, Prasanna P, Sun L, Ali A, Zou Z, Adam BL, McLeod DG, Moul JW, Srivastava S. Diagnostic potential of serum proteomic patterns in prostate cancer. *J Urol*. 2003. 170:442-446.
- Bargagli, R. Trace elements in terrestrial plants. *An Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery*, Springer Verlag, Berlin. 1998.
- Barnea E, Sorkin R, Ziv T, Beer I, Admon A. Evaluation of prefractionation methods as a preparatory step for multidimensional based chromatography of serum proteins. *Proteomics*. 2005. 5:3367-3375.

- Barneah O, Benayahu Y, Weis VM. Comparative proteomics of symbiotic and aposymbiotic juvenile soft corals. *Mar Biotechnol*. 2006. 8:11-16.
- Basile, A., Sorbo, S., Pisani, T., Paoli, L., Munzi, S., Loppi, S. Bioaccumulation and ultrastructural effects of Cd, Cu, Pb and Zn in the moss *Scorpiurum circinatum* (Brid.) Fleisch. & Loeske. *Environ. Pollut*. 2012. 166:208-211.
- Bast RC Jr. Status of tumor markers in ovarian cancer screening. *J Clin Oncol*. 2003. 21(10 Suppl):200-205.
- Baessant T, Bougueleret L, Johnson A, Rogers J, Menin L, Hall M, Aberg PM, Rose K. Effective depletion of albumin using a new peptide-based affinity medium. *Proteomics*. 2005. 5:973-977.
- Becker S, Cazares LH, Watson P, Lynch H, Semmes OJ, Drake RR, Laronga C. Surfaced-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) differentiation of serum protein profiles of BRCA-1 and sporadic breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2004. 11:907-914.
- Bell RL, Kimpel MW, Rodd ZA, Strother WN, Bai F, Peper CL, Mayfield RD, Lumeng L, Crabb DW, McBride WJ, Witzmann FA. Protein expression changes in the nucleus accumbens and amygdala of inbred alcohol-preferring rats given either continuous or scheduled access to ethanol. *Alcohol*. 2006. 40:3-17.
- Bengtsson S, Krogh M, Szigartyo CA, Uhlen M, Schedvins K, Silfverswärd C, Linder S, Auer G, Alaiya A, James P. Large-scale proteomics analysis of human ovarian cancer for biomarkers. *J Proteome Res*. 2007. 6:1440-1450.
- Berhane BT, Zong C, Liem DA, Huang A, Le S, Edmondson RD, Jones RC, Qiao X, Whitelegge JP, Ping P, Vondriska TM. Cardiovascular-related proteins identified in human plasma by the HUPO Plasma Proteome Project pilot phase. *Proteomics*. 2005. 5:3520-3530.
- Bermúdez-Crespo J, López JL. A better understanding of molecular mechanisms underlying human disease. *Proteomics Clin Appl*. 2007a. 1:983-1003.
- Bermúdez-Crespo J, López JL. Possibilities of two-dimensional gel electrophoresis in the understanding of human disease. *Current Proteomics*. 2007b. 4:187-197.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*. 1982. 6:317-339.

- Björhall K, Miliotis T, Davidsson P. Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics*. 2005. 5:307-317.
- Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*. 1999. 17:121-127. Review.
- Block TM, Comunale MA, Lowman M, Steel LF, Romano PR, Fimmel C, Tennant BC, London WT, Evans AA, Blumberg BS, Dwek RA, Mattu TS, Mehta AS. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. 102:779-784.
- Blomberg A, Blomberg L, Norbeck J, Fey SJ, Larsen PM, Larsen M, Roepstorff P, Degand H, Boutry M, Posch A, et al. Interlaboratory reproducibility of yeast protein patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1995. 16:1935-45.
- Body SC, Collard CD, Shernan SK, Fox AA, Liu KY, Ritchie MD, Perry TE, Muehlschlegel JD, Aranki S, Donahue BS, Pretorius M, Estrada JC, Ellinor PT, Newton-Cheh C, Seidman CE, Seidman JG, Herman DS, Lichtner P, Meitinger T, Pfeufer A, Kääb S, Brown NJ, Roden DM, Darbar D. Variation in the 4q25 chromosomal locus predicts atrial fibrillation after coronary artery bypass graft surgery. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009. 2:499-506.
- Boquete, MT, Fernández, JA, Carballeira, A., Aboal, JR. Assessing the tolerance of terrestrial moss *Pseudoscleropodium purum* to high levels of atmospheric heavy metals: a reciprocal transplant study. *Sci Total Environ*. 2013. 461-462:552-559
- Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C. Maes P. García MT, Ventosa A. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int J Syst Bacteriol*. 1996. 46:480-484.
- Bracco F, Gallo P, Tavalato B, Battistin L. Two-dimensional electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins in normal and pathological conditions. *Neurochem Res*. 1985. 10:1203-1219.
- Brichory F, Beer D, Le Naour F, Giordano T, Hanash S. Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer. *Cancer Res*. 2001. 61:7908-12.

- Bumann D. Pathogen proteomes during infection: A basis for infection research and novel control strategies. *J Proteomics*. 2010. 73:2267-2276.
- Burdine RD, Schier AF. Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation. *Genes Dev*. 2000. 14:763-776.
- Buscemi N, Murray C, Doherty-Kirby A, Lajoie G, Sussman MA, Van Eyk JE. Myocardial subproteomic analysis of a constitutively active Rac1-expressing transgenic mouse with lethal myocardial hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005. 289:H2325-2333.
- Caldwell RL, Caprioli RM. Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications. *Mol Cell Proteomics*. 2005. 4:394-401. Epub 2005 Jan 26.
- Campione M, Ros MA, Icardo JM, Piedra E, Christoffels VM, Schweickert A, Blum M, Franco D, Moorman AF. Pitx2 expression defines a left cardiac lineage of cells: evidence for atrial and ventricular molecular isomerism in the iv/iv mice. *Dev Biol*. Kitamura K, Miura H, Miyagawa-Tomita S, Yanazawa M, KatoH-Fukui Y, Suzuki R, Ohuchi H, Suehiro A, Motegi Y, Nakahara Y, Kondo S, Yokoyama M. Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and pericardial mesoderm and right pulmonary isomerism. *Development*. 1999. 126:5749-5758.
- Cañas B, Piñeiro C, Calvo E, López-Ferrer D, Gallardo JM. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *J Chromatogr A*. 2007. 1153:235-258.
- Carrette O, Demalte I, Scherl A, Yalkinoglu O, Corthals G, Burkhard P, Hochstrasser DF, Sanchez JC. A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Proteomics*. 2003. 3:1486-1494.
- Cash P, Argo E. Analysis of bacterial proteins by 2DE. *Methods Mol Biol*. 2009. 519:131-144.
- Cash P. Proteomics in the study of the molecular taxonomy and epidemiology of bacterial pathogens. *Electrophoresis*. 2009. 30:S133-S141.

- Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med*. 2002. 33:562-571.
- Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem*. 2002. 82:1524-1532.
- Castello, M. A comparison between two moss species used as transplants for airborne trace element biomonitoring in NE Italy. *Environ. Monit. Assess*. 2007. 133:267-76.
- Castro D, Santamaria JA, Luque A, Martínez-Manzanares E, Borrego JJ. Antigenic characterization of the etiological agent of the brown ring disease affecting Manila clams. *System Appl Microbiol*. 1996.19: 231-239.
- Castro D, Santamaria JA, Luque A, Martínez-Manzanares E, Borrego JJ. Determination of the etiological agent of brown ring disease in southwestern Spain. *Dis Aquat Org*. 1997. 29:181-188.
- Cecconi D, Astner H, Donadelli M, Palmieri M, Missiaglia E, Hamdan M, Scarpa A, Righetti PG. Proteomic analysis of pancreatic ductal carcinoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Electrophoresis*. 2003. 24:4291-4303.
- Cecconi D, Donadelli M, Rinalducci S, Zolla L, Scupoli MT, Scarpa A, Palmieri M, Righetti PG. Proteomic analysis of pancreatic endocrine tumor cell lines treated with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Proteomics*. 2007. 7:1644-1653.
- Cecconi D, Donadelli M, Scarpa A, Milli A, Palmieri M, Hamdan M, Areces LB, Rappsilber J, Righetti PG. Proteomic analysis of pancreatic ductal carcinoma cells after combined treatment with gemcitabine and trichostatin A. *J Proteome Res*. 2005. 4:1909-1916.
- Cecconi D, Scarpa A, Donadelli M, Palmieri M, Hamdan M, Astner H, Righetti PG. Proteomic profiling of pancreatic ductal carcinoma cell lines treated with trichostatin-A. *Electrophoresis*. 2003. 24:1871-1878.

- Cenci, RM., 1998. L'utilizzo de muschi indigeni e trapiantati: proposta di normativa. Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale". Roma, 26-27 November.
- Chan CK, Lucas DA, Hise D, Schaefer CF, Xiao Z, Janini GM, Buetow, KH, Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads, TP. Analysis of the human serum proteome. 2004. 3:311-326.
- Charlwood J, Skehel JM, King N, Camilleri P, Lord P, Bugelski P, Atif U. Proteomic analysis of rat kidney cortex following treatment with gentamicin. J Proteome Res. 2002. 1:73-82.
- Charrier JP, Tournel C, Michel S, Comby S, Jolivet-Reynaud C, Passagot J, Dalbon P, Chautard D, Jolivet M. Differential diagnosis of prostate cancer and benign prostate hyperplasia using two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis. 2001. 22:1861-1866.
- Chaurand P, Schwartz SA, Caprioli RM. Assessing protein patterns in disease using imaging mass spectrometry. J Proteome Res. 2004. 3:245-252.
- Chen G, Gharib TG, Huang CC, Thomas DG, Shedden KA, Taylor JM, Kardia SL, Misek DE, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. Clin Cancer Res. 2002. 8:2298-2305.
- Chen G, Gharib TG, Thomas DG, Huang CC, Misek DE, Kuick RD, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Proteomic analysis of eIF-5A in lung adenocarcinomas. Proteomics. 2003. 3:496-504.
- Chen G, Wang H, Gharib TG, Huang CC, Thomas DG, Shedden KA, Kuick R, Taylor JM, Kardia SL, Misek DE, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. Overexpression of oncoprotein 18 correlates with poor differentiation in lung adenocarcinomas. Mol Cell Proteomics. 2003. 2:107-116.
- Chen YY, Lin SY, Yeh YY, Hsiao HH, Wu CY, Chen ST, Wang AH. A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. Electrophoresis. 2005. 26:2117-2127.
- Chinchilla A, Daimi H, Lozano-Velasco E, Dominguez JN, Caballero R, Delpón E, Tamargo J, Cinca J, Hove-Madsen L, Aranega AE, Franco D. PITX2 insufficiency leads to atrial electrical and structural remodeling linked to arrhythmogenesis. Circ Cardiovasc Genet. 2011. 4:269-269

- Cho SY, Lee EY, Lee JS, Kim HY, Park JM, Kwon MS, Park YK, Lee HJ, Kang MJ, Kim JY, Yoo JS, Park SJ, Cho JW, Kim HS, Paik YK. Efficient prefractionation of low-abundance proteins in human plasma and construction of a two-dimensional map. *Proteomics*. 2005. 5:3386-3396.
- Choquet G, Soudant P, Lambert C, Nicolas JL, Paillard C. Reduction of adhesion properties on *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Org*. 2003. 57:109-116.
- Choquet G. Pathogénie de *Vibrio tapetis*, bacteria responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde: Approche cellulaire et moléculaire. PhD thesis. 2004. University of Brest.
- Chrambach I, Dunn MJ, Radola BJ. *Advances in Electrophoresis*. Vol I, VCH. 1987. Weinheim.
- Chu G, Kerr JP, Mitton B, Egnaczyk GF, Vazquez JA, Shen M, Kilby GW, Stevenson TI, Maggio JE, Vockley J, Rapundalo ST, Kranias EG. Proteomic analysis of hyperdynamic mouse hearts with enhanced sarcoplasmic reticulum calcium cycling. *FASEB J*. 2004. 18:1725-1727.
- Chung WJ, Shu HY, Lu CY, Wu CY, Tseng YH, Tsai SF, Lin CH. Qualitative and comparative proteomic analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 17. *Proteomics*. 2007. 7:2047-2058.
- Clarke W, Silverman BC, Zhang Z, Chan DW, Klein AS, Molmenti EP. Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Ann Surg*. 2003. 237:660-664.
- Coelho A, de Oliveira Santos E, Faria ML, de Carvalho DP, Soares MR. von Kruger WM, Bisch PM. A proteome reference map for *Vibrio cholerae* El Tor. *Proteomics*. 2004. 4:1491-1504.
- Cokkinos DV, Pantos C. Myocardial remodeling, an overview. *Heart Fail Rev*. 2011. 16:1-4.
- Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*. 2003. 300:286-290.
- Comunale MA, Lowman M, Long RE, Krakover J, Philip R, Seeholzer S, Evans AA, Hann HW, Block TM, Mehta AS. Proteomic analysis of serum associated fucosylated glycoproteins in the development of primary hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res*. 2006. 5:308-315.

- Coombes KR, Tsavachidis S, Morris JS, Baggerly KA, Hung MC, Kuerer HM. Improved peak detection and quantification of mass spectrometry data acquired from surface-enhanced laser desorption and ionization by denoising spectra with the undecimated discrete wavelet transform. *Proteomics*. 2005. 5:4107-4117.
- Corbett JM, Dunn MJ, Posch A, Görg A. Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis*. 1994. 15:1205-1211.
- Corbett JM, Why HJ, Wheeler CH, Richardson PJ, Archard LC, Yacoub MH, Dunn MJ. Cardiac protein abnormalities in dilated cardiomyopathy detected by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998. 19:2031-2042.
- Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JC. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis*. 2000. 21:1104-1115.
- Cui, S., Hu, J., Guo, S., Wan, J., Cheng, Y., Dang, X., Wu, L., He, Y. Proteome analysis of *Physcomitrella patens* exposed to progressive dehydration and rehydration. *J Exp Bot*. 2012. 63:711-726.
- Cullingford TE, Wait R, Clerk A, Sugden PH. Effects of oxidative stress on the cardiac myocyte proteome: modifications to peroxiredoxins and small heat shock proteins. *J Mol Cell Cardiol*. 2006. 40:157-172.
- Cumming, JR., Taylor, GJ. Mechanisms of metal tolerance in plants: physiological adaptations for exclusion of metal ions from the cytoplasm. Alscher, R.G., Cumming, J.R. (eds.) *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*. 1990. Wiley-Liss, New York, pp 329-356.
- Cutler P, Bell DJ, Birrell HC, Connelly JC, Connor SC, Holmes E, Mitchell BC, Monté SY, Neville BA, Pickford R, Polley S, Schneider K, Skehel JM. An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity. *Electrophoresis*. 1999. 20:3647-3658.
- Dai S, Chen T, Chong K, Xue Y, Liu S, Wang T. Proteomics identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated *Oryza sativa* pollen. *Mol Cell Proteomics*. 2007. 6:207-230.

- Davidsson P, Sjögren M. The use of proteomics in biomarker discovery in neurodegenerative diseases. *Dis Markers*. 2005. 21:81-92.
- Davidsson P, Westman-Brinkmalm A, Nilsson CL, Lindbjer M, Paulson L, Andreasen N, Sjögren M, Blennow K. Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients. *Neuroreport*. 2002. 13:611-615.
- Dayal B, Ertel NH. ProteinChip technology: a new and facile method for the identification and measurement of high-density lipoproteins apoA-I and apoA-II and their glycosylated products in patients with diabetes and cardiovascular disease. *J Proteome Res*. 2002. 1:375-380.
- De La Fuente M, Borrajo A, Bermúdez J, Lores M, Alonso J, López M, Santalla M, De Ron AM, Zapata C, Alvarez G. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *J Proteomics*. 2011. 74:262-267.
- de Lange FJ, Moorman AF, Christoffels VM. Atrial cardiomyocyte-specific expression of Cre recombinase driven by an Nppa gene fragment. *Genesis*. 2003. 37:1-4.
- de Marqui AB, Vidotto A, Polachini GM, Bellato C de M, Cabral H, Leopoldino AM, de Góis, Filho JF, Fukuyama EE, Settanni FA, Cury PM, Bonilla-Rodriguez GO, Palma MS, Tajara EH. Solubilization of proteins from human lymph node tissue and two-dimensional gel storage. *J Biochem Mol Biol*. 2006. 39:216-222.
- de Wildt RM, Mundy CR, Gorick BD, Tomlinson IM. Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nat Biotechnol*. 2001. 18:989-94.
- Debouck C, Goodfellow PN. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet*. 1999. 21:48-50.
- Dépagne J, Chevalier F. Technical updates to basic proteins focalization using IPG strips. *Proteome Sci*. 2012. 10:54.
- Domínguez JN, de la Rosa A, Navarro F, Franco D, Aránega AE. Tissue distribution and subcellular localization of the cardiac sodium channel during mouse heart development. *Cardiovasc Res*. 2008. 78:45-52.
- Domínguez JN, Navarro F, Franco D, Thompson RP, Aránega AE. Temporal and spatial expression pattern of beta1 sodium channel subunit during heart development. *Cardiovasc Res*. 2005. 65:842-850.

- Donahue MP, Rose K, Hochstrasser D, Vonderscher J, Grass P, Chibout SD, Nelson CL, Sinnaeve P, Goldschmidt-Clermont PJ, Granger CB. Discovery of proteins related to coronary artery disease using industrial-scale proteomics analysis of pooled plasma. *Am Heart J*. 2006. 152:478-485
- Dopson M, Baker-Austin C, Bond PL. First use of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to determine phylogenetic relationships. *J Microbiol Methods*. 2004. 58:297-2302.
- Doustjalali SR, Yusof R, Yip CH, Looi LM, Pillay B, Hashim OH. Aberrant expression of acute-phase reactant proteins in sera and breast lesions of patients with malignant and benign breast tumors. *Electrophoresis*. 2004. 25:2392-2401.
- Dreus J. Stategic trends in the drug industry. *Drug Discov Today*. 2003. 8 :411-420
- Dunn SD, Revington M, Cipriano DJ, Shilton BH. The b subunit of Escherichia coli ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr*. 2000. 32:347-355.
- Duran MC, Martín-Ventura JL, Mas S, Barderas MG, Dardé VM, Jensen ON, Egido J, Vivanco F. Characterization of the human atheroma plaque secretome by proteomic analysis. *Methods Mol Biol*. 2007. 357:141-150.
- Duran MC, Mas S, Martin-Ventura JL, Meilhac O, Michel JB, Gallego-Delgado J, Lázaro A, Tuñon J, Egido J, Vivanco F. Proteomic analysis of human vessels: application to atherosclerotic plaques. *Proteomics*. 2003. 3:973-978.
- Echan LA, Tang HY, Ali-Khan N, Lee K, Speicher DW. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics*. 2005. 5:3292-3303.
- Yocum AK, Yu K, Oe T, Blair IA. Effect of immunoaffinity depletion of human serum during proteomic investigations. *J Proteome Res*. 2005. 4:1722-1731.
- Eisenach JC, Thomas JA, Rauck RL, Curry R, Li X. Cystatin C in cerebrospinal fluid is not a diagnostic test for pain in humans. *Pain*. 2004. 107:207-212.
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA. Laser capture microdissection. *Science*. 1996. 274:998-1001.
- Endler AT, Young DS, Yanagihara T, Currie RM, Reid J. High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of cerebrospinal fluid in patients with neurological diseases. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1987. 25:61-70.

- Faber MJ, Dalinghaus M, Lankhuizen IM, Bezstarosti K, Dekkers DH, Duncker DJ, Helbing WA, Lamers JM. Proteomic changes in the pressure overloaded right ventricle after 6 weeks in young rats: correlations with the degree of hypertrophy. *Proteomics*. 2005. 5:2519-2530.
- Fach EM, Garulacan LA, Gao J, Xiao Q, Storm SM, Dubaquié YP, Hefta SA, Opitck GJ. In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2004. 3:1200-1210.
- Feng JT1, Liu YK, Song HY, Dai Z, Qin LX, Almofti MR, Fang CY, Lu HJ, Yang PY, Tang ZY. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics*. 2005. 5:4581-4588.
- Fernández, JA., Aboal, JR., Real, C., Carballeira, A. A new moss biomonitoring method for detecting sources of small scale pollution. *Atmos. Environ*. 2007. 41: 2098-2110.
- Fish RG, Gill TS, Adams M, Kerby I. Serum haptoglobin and alpha 1-acid glycoprotein as indicators of the effectiveness of cis-diamminedichloro-platinum (CDDP) in ovarian cancer patients--a preliminary report. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1984. 20:625-630.
- Fitter, AH., Hay, RKM., 1987. *Environmental physiology of plants*. Academic Press, London.
- Florian-Kujawski M, Hussain W, Chyna B, Kahn S, Hoppensteadt D, Leya F, Fareed J. Biomarker profiling of plasma from acute coronary syndrome patients. Application of ProteinChip Array analysis. *Int Angiol*. 2004. 23:246-254.
- Flory MR, Griffin TJ, Martin D, Aebersold R. Advances in quantitative proteomics using stable isotope tags. *Trends Biotechnol*. 2002. 20:S23-29.
- Fonteh AN, Harrington RJ, Huhmer AF, Biringer RG, Riggins JN, Harrington MG. Identification of disease markers in human cerebrospinal fluid using lipidomic and proteomic methods. *Dis Markers*. 2006. 22:39-64.
- Fountoulakis M, Juranville JF, Jiang L, Avila D, Röder D, Jakob P, Berndt P, Evers S, Langen H. Depletion of the high-abundance plasma proteins. *Amino Acids*. 2004. 27:249-259.

- Fountoulakis M, Juranville JF, Röder D, Evers S, Berndt P, Langen H. Reference map of the low molecular mass proteins of *Haemophilus influenzae*. *Electrophoresis*. 1998. 19:1819-1827.
- Fountoulakis M, Kossida S. Proteomics-driven progress in neurodegeneration research. *Electrophoresis*. 2006. 27:1556-1573.
- Freeman WM, Hemby SE. Proteomics for protein expression profiling in neuroscience. *Neurochem Res*. 2004. 29:1065-1081.
- Fu Q, Garnham CP, Elliott ST, Bovenkamp DE, Van Eyk JE. A robust, streamlined, and reproducible method for proteomic analysis of serum by delipidation, albumin and IgG depletion, and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 2005. 5:2656-2664.
- Fukuyama R, Mizuno T, Mori S, Yanagisawa K, Nakajima K, Fushiki S. Age-dependent decline in the apolipoprotein E level in cerebrospinal fluid from control subjects and its increase in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Eur Neurol*. 2000. 43:161-169.
- Gage PJ, Suh H, Camper SA. Dosage requirement of *Pitx2* for development of multiple organs. *Development*. 1999. 126:4643-4651.
- Gagna CE, Winokur D, Clark Lambert W. Cell biology, chemogenomics and chemoproteomics. *Cell Biol Int*. 2004. 28:755-764.
- Gallego-Delgado J, Lazaro A, Osende JI, Barderas MG, Blanco-Colio LM, Duran MC, Martin-Ventura JL, Vivanco F, Egido J. Proteomic approach in the search of new cardiovascular biomarkers. *Kidney Int Suppl*. 2005. 99:S103-107.
- García A. Proteome analysis of signaling cascades in human platelets. *Blood Cells Mol Dis*. 2006. 36:152-156.
- Gavin AC, Bösch M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Höfert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edelman A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 2002. 415:141-147.

- Gevaert K, Vandekerckhove J. Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis*. 2000. 21:1145-1154.
- Geyer CR, Brent R. Selection of genetic agents from random peptide aptamer expression libraries. *Methods Enzymol*. 2000. 328:171-208.
- Gietl C. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochim Biophys Acta* 1992;1100:217-234.
- Goldberg HA, Domenicucci C, Pringle GA, Sodek J. Mineral-binding proteoglycans of fetal porcine calvarial bone. *J Biol Chem*. 1988. 263:12092-12101.
- Goldfarb MF. Two-dimensional electrophoretic analysis of immunoglobulin patterns in monoclonal gammopathies. *Electrophoresis*. 1992. 13:440-444.
- González-Buitrago JM, Ferreira L, Lorenzo I. Urinary proteomics. *Clin Chim Acta*. 2007. 375:49-56.
- Görg A, Boguth G, Köpf A, Reil G, Parlar H, Weiss W. Sample prefractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels. *Proteomics*. 2002. 2:1652-1657.
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000. 21:1037-1053.
- Görg A, Postel W, Günther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1988. 9:531-546.
- Goufman EI, Moshkovskii SA, Tikhonova OV, Lokhov PG, Zgoda VG, Serebryakova MV, Toropygin IY, Vlasova MA, Safarova MR, Makarov OV, Archakov AI. Two-dimensional electrophoretic proteome study of serum thermostable fraction from patients with various tumor conditions. *Biochemistry (Mosc)*. 2006. 71:354-360.
- Gragerov A, Nudler E, Komissarova N, Gaitanaris GA, Gottesman ME, Nikiforov V. Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992. 89:10341-10344.
- Granger J, Siddiqui J, Copeland S, Remick D. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. *Proteomics*. 2005. 5:4713-4718.

- Grover S, Quinn MA, Weideman P, Koh H, Robinson HP, Rome R, Cauchi M. Screening for ovarian cancer using serum CA125 and vaginal examination: report on 2550 females. *Int J Gynecol Cancer*. 1995. 5:291-295.
- Gudbjartsson DF, Arnar DO, Helgadóttir A, Gretarsdóttir S, Holm H, Sigurdsson A, Jonasdóttir A, Baker A, Thorleifsson G, Kristjánsson K, Pálsson A, Blondal T, Sulem P, Backman VM, Hardarson GA, Páldóttir E, Helgason A, Sigurjonsdóttir R, Sverrisson JT, Kostulas K, Ng MC, Baum L, So WY, Wong KS, Chan JC, Furie KL, Greenberg SM, Sale M, Kelly P, MacRae CA, Smith EE, Rosand J, Hillert J, Ma RC, Ellinor PT, Thorgeirsson G, Gulcher JR, Kong A, Thorsteinsdóttir U, Stefansson K. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nature*. 2007. 448:353-357.
- Guillaume E, Zimmermann C, Burkhard PR, Hochstrasser DF, Sanchez JC. A potential cerebrospinal fluid and plasmatic marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proteomics*. 2003. 3:1495-1499.
- Gygi SP, Rochon Y, Franz BR., Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 1999. 19:1720-1730.
- Hamdan M, Righetti PG. *Proteomics Today: Protein Assessment and Biomarkers Using Mass Spectrometry, 2D Electrophoresis, and Microarray Technology*. 2005. 1st Ed. Wiley-Interscience.
- Hanash S. The emerging field of protein microarrays. *Proteomics*. 2003. 3:2075.
- Hanash SM. Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: current status. *Electrophoresis*. 2000. 21:1202-1209.
- Hanson RW, Patel YM. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP): the gene and the enzyme. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1994. 69:203-281.
- Harrington MG, Merrill CR. Two-dimensional electrophoresis and "ultrasensitive" silver staining of cerebrospinal fluid proteins in neurological diseases. *Clin Chem*. 1984. 30:1933-1937.
- Harrison HH, Miller KL, Abu-Alfa A, Podlasek SJ. Immunoglobulin clonality analysis. Resolution of ambiguities in immunofixation electrophoresis results by high-resolution, two-dimensional electrophoretic analysis of paraprotein bands eluted from agarose gels. *Am J Clin Pathol*. 1993. 100:550-560.

- Harrison HH. Patient-specific microheterogeneity patterns of monoclonal immunoglobulin light chains as revealed by high resolution, two-dimensional electrophoresis. *Clin Biochem*. 1992. 25:235-243.
- Hayano T, Takahashi N, Kato S, Maki N, Suzuki M. Two distinct forms of peptidylprolyl-cis-trans-isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of *Escherichia coli* cells. *Biochemistry*. 1991. 30:3041-3048.
- He QY, Lau GK, Zhou Y, Yuen ST, Lin MC, Kung HF, Chiu JF. Serum biomarkers of hepatitis B virus infected liver inflammation: a proteomic study. *Proteomics*. 2003. 3:666-674.
- Heinke MY, Wheeler CH, Chang D, Einstein R, Drake-Holland A, Dunn MJ, dos Remedios CG. Protein changes observed in pacing-induced heart failure using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998. 19:2021-2030.
- Heinke MY, Wheeler CH, Yan JX, Amin V, Chang D, Einstein R, Dunn MJ, dos Remedios CG. Changes in myocardial protein expression in pacing-induced canine heart failure. *Electrophoresis*. 1999. 20:2086-2093.
- Heller M, Stalder D, Schlappritzi E, Hayn G, Matter U, Haeberli A. Mass spectrometry-based analytical tools for the molecular protein characterization of human plasma lipoproteins. *Proteomics*. 2005. 5:2619-2630.
- Herbert BR, Molloy MP, Gooley AA, Walsh BJ, Bryson WG, Williams KL. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis*. 1998.19:845-851.
- Hirano T, Franzén B, Uryu K, Okuzawa K, Alaiya AA, Vanky F, Rodrigues L, Ebihara Y, Kato H, Auer G. Detection of polypeptides associated with the histopathological differentiation of primary lung carcinoma. *Br J Cancer*. 1995. 72:840-848.

- Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, Vo M, Taggart J, Goudreault M, Muskat B, Alfaro C, Dewar D, Lin Z, Michalickova K, Willems AR, Sassi H, Nielsen PA, Rasmussen KJ, Andersen JR, Johansen LE, Hansen LH, Jespersen H, Podtelejnikov A, Nielsen E, Crawford J, Poulsen V, Sørensen BD, Matthiesen J, Hendrickson RC, Gleeson F, Pawson T, Moran MF, Durocher D, Mann M, Hogue CW, Figeys D, Tyers M. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*. 2002. 415:180-183.
- Hochstrasser DF, Tissot JD. Clinical applications of high-resolution two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Adv. Electrophor.* 1993. 6:268:375.
- Holy, M., Leblond, S., Pesch, R., Schröder, W. Assessing spatial patterns of metal bioaccumulation in French mosses by means of an exposure index. *Environ. Sci. Pollut.* 2009. 16:499–507.
- Hoorn EJ, Pisitkun T, Zietse R, Gross P, Frokiaer J, Wang NS, Gonzales PA, Star RA, Knepper MA. Prospects for urinary proteomics: exosomes as a source of urinary biomarkers. *Nephrology (Carlton)*. 2005. 10:283-290.
- Hou Y, Le Bihan MC, Vega-Avelaira D, Coulton GR. Proteomic changes in hearts of kyphoscoliosis (ky) mutant mice in the absence of structural pathology: implication for the analysis of early human heart disease. *Proteomics*. 2006. 6:3096-3108.
- Hu S, Loo JA, Wong DT. Human body fluid proteome analysis. *Proteomics*. 2006. 6:6326-6353.
- Huang HL, Stasyk T, Morandell S, Dieplinger H, Falkensammer G, Griesmacher A, Mogg M, Schreiber M, Feuerstein I, Huck CW, Stecher G, Bonn GK, Huber LA. Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis/ MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays. *Electrophoresis*. 2006. 27:1641-1650.
- Huang L, Harvie G, Feitelson JS, Gramatikoff K, Herold DA, Allen DL, Amunngama R, Hagler RA, Pisano MR, Zhang WW, Fang X. Immunoaffinity separation of plasma proteins by IgY microbeads: meeting the needs of proteomic sample preparation and analysis. *Proteomics*. 2005. 5:3314-3328.

- Hutchens TW, Yip TT. New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993. 7. 576-580.
- Irmak S, Tilki D, Heukeshoven J, Oliveira-Ferrer L, Friedrich M, Huland H, Ergün S. Stage-dependent increase of orosomucoid and zinc-alpha2-glycoprotein in urinary bladder cancer. *Proteomics.* 2005. 5:4296-4304.
- Jain S, Rajput A, Kumar Y, Uppuluri N, Arvind AS, Tatu U. Proteomic analysis of urinary protein markers for accurate prediction of diabetic kidney disorder. *J Assoc Physicians India.* 2005. 53:513-520.
- Jay DG. Selective destruction of protein function by chromophore-assisted laser inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988. 85:5454-5458.
- Jellum E, Kvittingen EA, Thoresen O, Guldal G, Horn L, Seip R, Stokke O. Systematic laboratory diagnosis of human metabolic disorders. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1986. 184:11-20.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006. 56:106-130.
- Jin X, Xia L, Wang LS, Shi JZ, Zheng Y, Chen WL, Zhang L, Liu ZG, Chen GQ, Fang NY. Differential protein expression in hypertrophic heart with and without hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Proteomics.* 2006. 6:1948-1956.
- Johnson MD, Yu LR, Conrads TP, Kinoshita Y, Uo T, McBee JK, Veenstra TD, Morrison RS. The proteomics of neurodegeneration. *Am J Pharmacogenomics.* 2005. 5:259-270.
- Jones MB, Krutzsch H, Shu H, Zhao Y, Liotta LA, Kohn EC, Petricoin EF 3rd. Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics.* 2002. 2:76-84.
- Jones TH, Johns MW, Gill CO. Changes in the proteome of *Escherichia coli* during growth at 15°C after incubation at 2, 6 or 8°C for 4 days. *Int J Food Microbiol.* 2008. 124:299-302.
- Jules, ES., Shaw, A.J. Adaptation to metal-contaminated soils in populations of the moss, *Ceratodon purpureus*: vegetative growth and reproductive expression. *Am. J. Bot.* 1994. 81/6:791-797.

- Jung K, Reiche J, Boehme A, Stephan C, Loening SA, Schnorr D, Hoesel W, Sinha P. Analysis of subforms of free prostate-specific antigen in serum by two-dimensional gel electrophoresis: potential to improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem*. 2004. 50:2292-2301.
- Jürgens M, Appel A, Heine G, Neitz S, Menzel C, Tammen H, Zucht HD. Towards characterization of the human urinary peptidome. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2005. 8:757-765.
- Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*. 2001. 10:657-662.
- Kan B, Habibi H, Schmid M, Liang W, Wang R, Wang D, Jungblut PR. Proteome comparison of *Vibrio cholerae* cultured in aerobic and anaerobic conditions. *Proteomics*. 2004. 4:3061-3067.
- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*. 1988. 60:2299-2301
- Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, Lindahl M. Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2005. 5:1431-1445.
- Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, Lindahl M. Lipoproteomics I: mapping of proteins in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2005. 5:551-565.
- Kawakami T, Hoshida Y, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ikenoue T, Obi S, Sato S, Teratani T, Shiina S, Kawabe T, Suzuki T, Hatano N, Taniguchi H, Omata M. Proteomic analysis of sera from hepatocellular carcinoma patients after radiofrequency ablation treatment. *Proteomics*. 2005. 5:4287-4295.
- Kennedy S. Proteomic profiling from human samples: the body fluid alternative. *Toxicol Lett*. 2001. 120:379-384.
- Khatoon A, Rehman S, Salavati A, Komatsu S. A comparative proteomics analysis in roots of soybean to compatible symbiotic bacteria under flooding stress. *Amino Acids*. 2012. 43:2513-2525.
- Kiraga J, Mackiewicz P, Mackiewicz D, Kowalczyk M, Biecek P, Polak N, Smolarczyk K, Dudek MR, Ceburat S. The relationships between the isoelectric point and: length of proteins, taxonomy and ecology of organisms. *BMC Genomics*. 2007. 8:163.

- Kirchhof P, Kahr PC, Kaese S, Piccini I, Vokshi I, Scheld HH, Rotering H, Fortmueller L, Laakmann S, Verheule S, Schotten U, Fabritz L, Brown NA. PITX2c is expressed in the adult left atrium, and reducing Pitx2c expression promotes atrial fibrillation inducibility and complex changes in gene expression. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011. 4:123-133.
- Kitakaze M, Minamino T, Node K, Takashima S, Funaya H, Kuzuya T, Hori M. Adenosine and cardioprotection in the diseased heart. *Jpn Circ J*. 1999. 63:231-243.
- Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 1992. 99:933-943.
- Klenø TG, Leonardsen LR, Kjeldal HØ, Laursen SM, Jensen ON, Baunsgaard D. Mechanisms of hydrazine toxicity in rat liver investigated by proteomics and multivariate data analysis. *Proteomics*. 2004. 4:868-880.
- Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*. 1975. 26:231-243.
- Knecht M, Regitz-Zagrosek V, Pleissner KP, Emig S, Jungblut P, Hildebrandt A, Fleck E. Dilated cardiomyopathy: computer-assisted analysis of endomyocardial biopsy protein patterns by two-dimensional gel electrophoresis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1994. 32:615-624.
- Knecht M, Regitz-Zagrosek V, Pleissner KP, Jungblut P, Steffen C, Hildebrandt A, Fleck E. Characterization of myocardial protein composition in dilated cardiomyopathy by two-dimensional gel electrophoresis. *Eur Heart J*. 1994. 15 Suppl D:37-44.
- Kolarcik C, Bowser R. Plasma and cerebrospinal fluid-based protein biomarkers for motor neuron disease. *Mol Diagn Ther*. 2006. 10:281-292.
- Kong F, Nicole White C, Xiao X, Feng Y, Xu C, He D, Zhang Z, Yu Y. Using proteomic approaches to identify new biomarkers for detection and monitoring of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2006. 100:247-253.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998. 4:844-847.

- Koomen JM, Li D, Xiao LC, Liu TC, Coombes KR, Abbruzzese J, Kobayashi R. Direct tandem mass spectrometry reveals limitations in protein profiling experiments for plasma biomarker discovery. *J Proteome Res*. 2005. 4:972-981.
- Korc M. Diabetes mellitus in the era of proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2003. 2:399-404.
- Kozak KR, Amneus MW, Pusey SM, Su F, Luong MN, Luong SA, Reddy ST, Farias-Eisner R. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 100:12343-12348
- Kuboniwa M, Tribble GD, Hendrickson EL, Amano A, Lamont RJ, Hackett M. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2012. 9:311-323.
- Kubota K, Wakabayashi K, Matsuoka T. Proteome analysis of secreted proteins during osteoclast differentiation using two different methods: two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tags analysis with two-dimensional chromatography. *Proteomics*. 2003. 3:616-626.
- Kumagai K, Ando Y, Kiyosawa N, Ito K, Kawai R, Yamoto T, Manabe S, Teranishi M. Toxicoproteomic investigation of the molecular mechanisms of cycloheximide-induced hepatocellular apoptosis in rat liver. *Toxicology*. 2006. 228:299-309.
- Kuramitsu Y, Harada T, Takashima M, Yokoyama Y, Hidaka I, Iizuka N, Toda T, Fujimoto M, Zhang X, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Increased expression and phosphorylation of liver glutamine synthetase in well-differentiated hepatocellular carcinoma tissues from patients infected with hepatitis C virus. *Electrophoresis*. 2006. 27:1651-1658
- Kuruma H, Egawa S, Oh-Ishi M, Kodera Y, Satoh M, Chen W, Okusa H, Matsumoto K, Maeda T, Baba S. High molecular mass proteome of androgen-independent prostate cancer. *Proteomics*. 2005. 5:1097-1112.
- Labugger R, Organ L, Collier C, Atar D, Van Eyk JE. Extensive troponin I and T modification detected in serum from patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2000. 102:1221-1226.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 227: 680-685.

- Lagerholm S, Lagerholm S, Dutta S, Nair P. Non-invasive detection of c-myc p64, c-myc p67 and c-erbB-2 in colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol*. 2005. 40:1343-1350.
- Lakhal F, Bury-Moné S, Nomane Y, Le Goïc NL, Paillard C, Jacq A. DjlA, a membrane- anchored DnaJ-like protein, is required for cytotoxicity of clam pathogen *Vibrio tapetis* to hemocytes. *Appl Environm Microbiol*. 2008. 74:5750-5758.
- Lamond AI, Mann M. *Trends in Cell Biol*. 1998. 7:139:142.
- Lane E, Birkbeck TH. Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *J Fish Dis*. 2000. 23:275-279.
- Lang, I., Weirnitzen, S. Sequestration at the cell wall and plasma membrane facilitates zinc tolerance in the moss *Pohlia drummondii*. *Environ. Exp. Bot*. 2011. 74:186– 193.
- Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*, Springer, Berlin.
- Le Chevalier P, Boula C, Paillard C. Characterization by restriction fragment length polymorphism and plasmid profiling of *Vibrio tapetis* strains. *J Basic Microbiol*. 2003. 5:414-422.
- Lee AY, Park SG, Jang M, Cho S, Myung PK, Kim YR, Rhee JH, Lee DH, Park BC. Proteomic analysis of pathogenic bacterium *Vibrio vulnificus*. *Proteomics*. 2006. 6:1283-1289.
- Lee IN, Chen CH, Sheu JC, Lee HS, Huang GT, Yu CY, Lu FJ, Chow LP. Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2005. 4:2062-2069.
- Lee SW, Lee KI, Kim JY. Revealing urologic diseases by proteomic techniques. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005. 815:203-213.
- Lehrer S, Roboz J, Ding H, Zhao S, Diamond EJ, Holland JF, Stone NN, Droller MJ, Stock RG. Putative protein markers in the sera of men with prostatic neoplasms. *BJU Int*. 2003. 92:223-225.
- Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 96:7473-7478.

- Lexander H, Palmberg C, Auer G, Hellström M, Franzén B, Jörnvall H, Egevad L. Proteomic analysis of protein expression in prostate cancer. *Anal Quant Cytol Histol*. 2005. 27:263-272.
- Li C, Xiao Z, Chen Z, Zhang X, Li J, Wu X, Li X, Yi H, Li M, Zhu G, Liang S. Proteome analysis of human lung squamous carcinoma. *Proteomics*. 2006. 6:547-558.
- Li J, White N, Zhang Z, Rosenzweig J, Mangold LA, Partin AW, Chan DW. Detection of prostate cancer using serum proteomics pattern in a histologically confirmed population. *J Urol*. 2004. 171:1782-1787.
- Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem*. 2002. 48:1296-1304.
- Li X, Miyajima M, Mineki R, Taka H, Murayama K, Arai H. Analysis of potential diagnostic biomarkers in cerebrospinal fluid of idiopathic normal pressure hydrocephalus by proteomics. *Acta Neurochir (Wien)*. 2006. 148:859-864.
- Lin JF, Xu J, Tian HY, Gao X, Chen QX, Gu Q, Xu GJ, Song JD, Zhao FK. Identification of candidate prostate cancer biomarkers in prostate needle biopsy specimens using proteomic analysis. *Int J Cancer*. 2007. 121:2596-2605.
- Lingua G, Bona E, Todeschini V, Cattaneo C, Marsano F, Berta G, Cavaletto M. Effects of heavy metals and arbuscular mycorrhiza on the leaf proteome of a selected poplar clone: a time course analysis. *PLoS One*. 2012. 7:e38662.
- Link AL. 2-D Proteome Analysis Protocols. 1999. 1st ed. Humana Press. New Jersey.
- Liu C, Liu W, Lu MF, Brown NA, Martin JF. Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity. *Development*. 2001. 128: 2039-2048.
- Liu Y, Liu H, Han B, Zhang JT. Identification of 14-3-3sigma as a contributor to drug resistance in human breast cancer cells using functional proteomic analysis. *Cancer Res*. 2006. 66:3248-3255.
- Lopez MF, Berggren K, Chernokalskaya E, Lazarev A, Robinson, M, Patton WF. A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis*. 2000. 21:3673-3683.

- López-Cortés L, Luque A, Martínez-Manzanares E, Castro D, Borrego JJ. Adhesion of *Vibrio tapetis* to clam cells. J. Shellfish Res. 1999.18:91-97.
- López-Otín C, Overall CM. .Protease degradomics: a new challenge for proteomics. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002. 3:509-519.
- Lubitz SA, Sinner MF, Lunetta KL, Makino S, Pfeufer A, Rahman R, Veltman CE, Barnard J, Bis JC, Danik SP, Sonni A, Shea MA, Del Monte F, Perz S, Müller M, Peters A, Greenberg SM, Furie KL, van Noord C, Boerwinkle E, Stricker BH, Witteman J, Smith JD, Chung MK, Heckbert SR, Benjamin EJ, Rosand J, Arking DE, Alonso A, Kääb S, Ellinor PT. Independent susceptibility markers for atrial fibrillation on chromosome 4q25. Circulation. 2010. 122:976-84.
- Lueking A, Horn M, Eickhoff H, Büssow K, Lehrach H, Walter G. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. Anal Biochem. 1999. 270:103-111.
- Luttun A, Carmeliet P. De novo vasculogenesis in the heart.. Cardiovasc Res. 2003. 58:378-389.
- MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. Science. 2000. 289:1760-1763.
- MacCoss MJ, McDonald WH, Saraf A, Sadygov R, Clark JM, Tasto JJ, Gould KL, Wolters D, Washburn M, Weiss A, Clark JI, Yates JR 3rd. Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002. 99:7900-7905.
- Madrazo JA, Kelly DP. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. J Mol Cell Cardiol. 2008. 44:968-975.
- Malik G, Ward MD, Gupta SK, Trosset MW, Grizzle WE, Adam BL, Diaz JI, Semmes OJ. Serum levels of an isoform of apolipoprotein A-II as a potential marker for prostate cancer. Clin Cancer Res. 2005. 11:1073-1085.
- Malmström L, Malmström J, Aebersold R. Quantitative proteomics of microbes: Principles and applications to virulence. Proteomics. 2011. 11:2947-2956.
- Malorni L, Cacace G, Cuccurullo M, Pocsfalvi G, Chambery A, Farina A, Di Maro A, Parente A, Malorni A. Proteomic analysis of MCF-7 breast cancer cell line exposed to mitogenic concentration of 17beta-estradiol. Proteomics. 2006. 6:5973-5982.

- Mannes AJ, Martin BM, Yang HY, Keller JM, Lewin S, Gaiser RR, Iadarola MJ. Cystatin C as a cerebrospinal fluid biomarker for pain in humans. *Pain*. 2003. 102:251-256.
- Markert, B., Wappelhorst, O., Weckert, V., Herpin, U., Siewers, U., Friese, K., Breulmann, G. The use of bioindicators for monitoring the heavy-metal status of the environment. *J. Radioanal. Nucl. Ch.* 1999. 240/2:425-429.
- Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem.* 2005. 382:669-678.
- Marshall J, Kupchak P, Zhu W, Yantha J, Vrees T, Furesz S, Jacks K, Smith C, Kireeva I, Zhang R, Takahashi M, Stanton E, Jackowski G. Processing of serum proteins underlies the mass spectral fingerprinting of myocardial infarction. *J Proteome Res.* 2003. 2:361-372.
- Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM. Western array analysis of human atherosclerotic plaques: downregulation of apoptosis-linked gene 2. *Cardiovasc Res.* 2003. 60:259-267.
- Martin-Ventura JL, Duran MC, Blanco-Colio LM, Meilhac O, Leclercq A, Michel JB, Jensen ON, Hernandez-Merida S, Tuñón J, Vivanco F, Egido J. Identification by a differential proteomic approach of heat shock protein 27 as a potential marker of atherosclerosis. *Circulation.* 2004. 110:2216-2219.
- Martosella J, Zolotarjova N, Liu H, Nicol G, Boyes BE. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic prefractionation of immunodepleted human serum proteins to enhance mass spectrometry identification of lower-abundant proteins. *J Proteome Res.* 2005. 4:1522-1537.
- Meier M, Kaiser T, Herrmann A, Knueppel S, Hillmann M, Koester P, Danne T, Haller H, Fliser D, Mischak H. Identification of urinary protein pattern in type 1 diabetic adolescents with early diabetic nephropathy by a novel combined proteome analysis. *J Diabetes Complications.* 2005. 19:223-232.
- Meneses-Lorente G, Watt A, Salim K, Gaskell SJ, Muniappa N, Lawrence J, Guest PC. Identification of early proteomic markers for hepatic steatosis. *Chem Res Toxicol.* 2006. 19:986-998.
- Meyer HE, Stühler K. High-performance proteomics as a tool in biomarker discovery. *Proteomics.* 2007. 7 Suppl 1:18-26.

- Misek DE, Kuick R, Wang H, Galchev V, Deng B, Zhao R, Tra J, Pisano MR, Amunugama R, Allen D, Walker AK, Strahler JR, Andrews P, Omenn GS, Hanash SM. A wide range of protein isoforms in serum and plasma uncovered by a quantitative intact protein analysis system. *Proteomics*. 2005. 5:3343-3352.
- Molloy MP. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal Biochem*. 2000. 280:1-10.
- Mortz E, Krogh TN, Vorum H, Görg A. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*. 2001. 1:1359-1363.
- Moshkovskii SA, Serebryakova MV, Kuteykin-Teplyakov KB, Tikhonova OV, Goufman EI, Zgoda VG, Taranets IN, Makarov OV, Archakov AI. Ovarian cancer marker of 11.7 kDa detected by proteomics is a serum amyloid A1. *Proteomics*. 2005. 5:3790-3797.
- Mueller J, von Eggeling F, Driesch D, Schubert J, Melle C, Junker K. ProteinChip technology reveals distinctive protein expression profiles in the urine of bladder cancer patients. *Eur Urol*. 2005. 47:885-893.
- Nakatsura T, Senju S, Ito M, Nishimura Y, Itoh K. Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, coactosin-like protein, originally defined by the SEREX method. *Eur J Immunol*. 2002. 32:826-836.
- Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods*. 1994. 28: 239-242.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 1988. 9:255-262.
- Newsholme SJ, Maleeff BF, Steiner S, Anderson NL, Schwartz LW. Two-dimensional electrophoresis of liver proteins: characterization of a drug-induced hepatomegaly in rats. *Electrophoresis*. 2000. 21:2122-2128.
- Nishimura JS. Succinyl-CoA synthetase structure-function relationships and other considerations. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1986. 58:141-172.

- Nollau P, Mayer BJ. Profiling the global tyrosine phosphorylation state by Src homology 2 domain binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. 98:13531-13536.
- Norin M, Sundström M. Structural proteomics: developments in structure-to-function predictions. *Trends Biotechnol*. 2002. 20:79-84.
- Novoa B, Luque A, Castro D, Borrego JJ, Figueras A. Characterization and infectivity of four bacterial strains isolated from brown ring disease-affected clams. *J Invertebr Pathol*. 1998. 71:34-41.
- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975. 250: 4007-4021.
- O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*. 1977. 12:1133-1141.
- Okano T, Kondo T, Kakisaka T, Fujii K, Yamada M, Kato H, Nishimura T, Gemma A, Kudoh S, Hirohashi S. Plasma proteomics of lung cancer by a linkage of multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics*. 2006. 6:3938-3948.
- Okuzawa K, Franzén B, Lindholm J, Linder S, Hirano T, Bergman T, Ebihara Y, Kato H, Auer G. Characterization of gene expression in clinical lung cancer materials by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1994. 15:382-390.
- Olsson I, Larsson K, Palmgren R, Bjellqvist B. Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension. *Proteomics*. 2002. 2:1630-1632.
- Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, Apweiler R, Haab BB, Simpson RJ, Eddes JS, Kapp EA, Moritz RL, Chan DW, Rai AJ, Admon A, Aebersold R, Eng J, Hancock WS, Hefta SA, Meyer H, Paik YK, Yoo JS, Ping P, Pounds J, Adkins J, Qian X, Wang R, Wasinger V, Wu CY, Zhao X, Zeng R, Archakov A, Tsugita A, Beer I, Pandey A, Pisano M, Andrews P, Tammen H, Speicher DW, Hanash SM. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics*. 2005. 5:3226-3245.

- Omenn GS. The Human Proteome Organization Plasma Proteome Project pilot phase: reference specimens, technology platform comparisons, and standardized data submissions and analyses. *Proteomics*. 2004. 4:1235-1240.
- Ong SE, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture for quantitative proteomics. *Methods Mol Biol*. 2007. 359:37-52.
- O'Riordan E, Goligorsky MS. Emerging studies of the urinary proteome: the end of the beginning?. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005. 14:579-585.
- O'Riordan E, Orlova TN, Mei J J, Butt K, Chander PM, Rahman S, Mya M, Hu R, Momin J, Eng EW, Hampel DJ, Hartman B, Kretzler M, Delaney V, Goligorsky MS. Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2004. 15:3240-3248.
- Osman KM, Ali MM, Radwan MI, Kim HK, Han J. Comparative proteomic analysis on *Salmonella gallinarum* and *Salmonella enteridis* exploring proteins that may incorporate host adaptation in poultry. *J Proteomics*. 2009. 72:815-821.
- Ott HW, Lindner H, Sarg B, Mueller-Holzner E, Abendstein B, Bergant A, Fessler S, Schwaerzler P, Zeimet A, Marth C, Illmensee K. Calgranulins in cystic fluid and serum from patients with ovarian carcinomas. *Cancer Res*. 2003. 63:7507-7514.
- Paillard C, Maes P, Oubella R. Brown ring disease in clams. *Annu Rev Fish Dis*. 1994. 4:219-240.
- Paillard C, Maes P. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *J Invertebr Pathol*. 1995. 65:91-100.
- Paillard C. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat Living Resour*. 2004. 17:467-475.
- Pan YZ, Xiao XY, Zhao D, Zhang L, Ji GY, Li Y, Yang BX, He DC, Zhao XJ. Application of surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight-based serum proteomic array technique for the early diagnosis of prostate cancer. *Asian J Androl*. 2006. 8:45-51.
- Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000. 405:837-846.

- Park MR, Wang EH, Jin DC, Cha JH, Lee KH, Yang CW, Kang CS, Choi YJ. Establishment of a 2-D human urinary proteomic map in IgA nephropathy. *Proteomics*. 2006. 6:1066-1076.
- Patton WF. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis*. 2000. 21:1123-1144.
- Paweletz CP, Charboneau L, Bichsel VE, Simone NL, Chen T, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Roth MJ, Petricoin III EF, Liotta LA. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene*. 2001. 20:1981-1989.
- Peltier JB, Friso G, Kalume, DE, Roepstorff P, Nilsson F, Adamska I, van Wijk KJ. Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell*. 2000. 12:319-341.
- Petricoin EF 3rd, Ornstein DK, Paweletz CP, Ardekani A, Hackett PS, Hitt BA, Velasco A, Trucco C, Wiegand L, Wood K, Simone CB, Levine PJ, Linehan WM, Emmert-Buck MR, Steinberg SM, Kohn EC, Liotta LA. Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002. 94:1576-1578.
- Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 2002. 359:572-577.
- Petricoin EF, Rajapaske V, Herman EH, Arekani AM, Ross S, Johann D, Knapton A, Zhang J, Hitt BA, Conrads TP, Veenstra TD, Liotta LA, Sistiare FD. Toxicoproteomics: serum proteomic pattern diagnostics for early detection of drug induced cardiac toxicities and cardioprotection. *Toxicol Pathol*. 2004. 32 Suppl 1:122-130.
- Petricoin EF, Zoon KC, Kohn EC, Barrett JC, Liotta LA. Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat Rev Drug Discov*. 2002. 1:683-695.
- Phillips CI, Bogoy M. Proteomics meets microbiology: technical advances in the global mapping of protein expression and function. *Cell Microbiol*. 2005. 7:1061-1076.

- Pieper R, Gatlin CL, McGrath AM, Makusky AJ, Mondal M, Seonarain M, Field E, Schatz CR, Estock MA, Ahmed N, Anderson NG, Steiner S. Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics*. 2004. 4:1159-1174.
- Pieper R, Su Q, Gatlin CL, Huang ST, Anderson NL, Steiner S. Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: an innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome. *Proteomics*. 2003. 3:422-432.
- Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA. Discovery of urinary biomarkers. *Mol Cell Proteomics*. 2006. 5:1760-1771.
- Pleissner KP, Regitz-Zagrosek V, Weise C, Neuss M, Krüdwagen B, Söding P, Buchner K, Hucho F, Hildebrandt A, Fleck E. Chamber-specific expression of human myocardial proteins detected by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1995. 16:841-850.
- Poland J, Schadendorf D, Lage H, Schnölzer M, Celis JE, Sinha P. Study of therapy resistance in cancer cells with functional proteome analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2002. 40:221-234.
- Poobalan S, Thompson KD, Diab A, Ardó L, Jeney G, Adams A. Protein expression by *Aeromonas hydrophila* during growth in vitro and in vivo. *Microb Pathogen* 2008. 45:60-69.
- Poon TC, Yip TT, Chan AT, Yip C, Yip V, Mok TS, Lee CC, Leung TW, Ho SK, Johnson PJ. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem*. 2003. 49:752-760.
- Qu Y, Adam BL, Yasui Y, Ward MD, Cazares LH, Schellhammer PF, Feng Z, Semmes OJ, Wright GL Jr. Boosted decision tree analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectral serum profiles discriminates prostate cancer from noncancer patients. *Clin Chem*. 2002. 48:1835-1843.
- Qureshi MI, Qadir S, Zolla L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *J Plant Physiol*. 2007. 164:1239-1260.

- Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1997. 18: 307-316.
- Rabilloud T, Strub JM, Luche S, van Dorsselaer A, Lunardi J. A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics*. 2001. 1:699-704.
- Rabilloud T. Membrane proteins ride shotgun. *Nat Biotechnol*. 2003. 21:508-510.
- Rabilloud T. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998. 19:758-760.
- Richter, C., Dainty, J. Ion behaviour in plant cell walls. Characterization of the *Sphagnum russowii* cell wall ion exchanger. *Can. J. Botany*. 1989. 67:451-459.
- Righetti PG, Boschetti E, Lomas L, Citterio A. Protein Equalizer Technology : the quest for a "democratic proteome". *Proteomics*. 2006. 6:3980-3992.
- Righetti PG, Castagna A, Antonucci F, Piubelli C, Cecconi D, Campostrini N, Rustichelli C, Antonioli P, Zanusso G, Monaco S, Lomas L, Boschetti E. Proteome analysis in the clinical chemistry laboratory: myth or reality?. *Clin Chim Acta*. 2005. 357:123-139.
- Roberts EC., Hammond, K, Traish, AM, Resing, KA, Ahn, NG. Identification of G2/M targets for the MAP kinase pathway by functional proteomics. *Proteomics*. 2006. 6:4541-4553.
- Robinson WH, DiGennaro C, Hueber W, Haab BB, Kamachi M, Dean EJ, Fournel S, Fong D, Genovese MC, de Vegvar HE, Skriner K, Hirschberg DL, Morris RI, Muller S, Pruijn GJ, van Venrooij WJ, Smolen JS, Brown PO, Steinman L, Utz PJ. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med*. 2002. 8:295-301.
- Robinson WH, Steinman L, Utz PJ. Protein and peptide array analysis of autoimmune disease. *Biotechniques*. 2002. Suppl:66-69.
- Rodríguez JM, López-Romalde S, Beaz R, Alonso MC, Castro D, Romalde JL. Molecular fingerprinting of *Vibrio tapetis* strains using three PCR-based methods: ERIC-PCR, REP-PCR, and RAPD. *Dis Aquat Org*. 2006. 69:175-183.

- Rohlff C, Southan C. Proteomic approaches to central nervous system disorders. *Curr Opin Mol Ther.* 2002. 4:251-258.
- Romalde JL, Castro D, Magariños B, Lopez-Cortes L, Borrego JJ. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Vibrio tapetis*. *Syst Appl Microbiol.* 2002. 25:544-550.
- Romanowska E. Gas exchange functions in heavy metals stressed plants. and Kazimierz Strzalka, Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. 2002. 1st Ed. Springer.
- Roncada P, Deriu F, Gaviraghi A, Martino PA, Bonizzi L. Proteomic study of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains. *Vet Res Commun.* 2009. 33:157-160.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics.* 2004 3:1154-1169.
- Rowe CA, Scruggs SB, Feldstein MJ, Golden JP, Ligler FS. An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes. *Anal Chem.* 1999. 71:433-439.
- Roxo-Rosa M, da Costa G, Luider TM, Scholte BJ, Coelho AV, Amaral MD, Penque D. Proteomic analysis of nasal cells from cystic fibrosis patients and non-cystic fibrosis control individuals: search for novel biomarkers of cystic fibrosis lung disease. *Proteomics.* 2006. 6:2314-2325.
- Rubenwolf S, Niewöhner J, Meyer E, Petit-Frère C, Rudert F, Hoffmann PR, Ilag LL. Functional proteomics using chromophore-assisted laser inactivation. *Proteomics.* 2002. 2:241-246.
- Ruhling, A., Tyler, G. An ecological approach to the lead problem. *Bot. Notiser.* 1968. 122:248–342.
- Ruhling, A., Tyler, G. Sorption and retention of heavy metals in the woodland moss *Hylocomium splendens* (Hedw.) Br et Sch. *Oikos.* 1970. 21:92–97.
- Rui Z1, Jian-Guo J, Yuan-Peng T, Hai P, Bing-Gen R. Use of serological proteomic methods to find biomarkers associated with breast cancer. *Proteomics.* 2003. 3:433-439.

- Sacher RA, McPherson RA. Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Test, F.A. Davis Co., Philadelphia PA. 2000.
- Saito M, Kimoto M, Araki T, Shimada Y, Fujii R, Oofusa K, Hide M, Usui T, Yoshizato K. Proteome analysis of gelatin-bound urinary proteins from patients with bladder cancers. *Eur Urol.* 2005. 48:865-871.
- Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis.* 2000. 21:1054-1070.
- Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 1987. 166:368-379.
- Schaub S, Rush D, Wilkins J, Gibson IW, Weiler T, Sangster K, Nicolle L, Karpinski M, Jeffery J, Nickerson P. Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2004. 15:219-227.
- Schuster, RM. (ed.), 1983. New manual of bryology. Nichinan.
- Schutter EM, Davelaar EM, van Kamp GJ, Verstraeten RA, Kenemans P, Verheijen RH. The differential diagnostic potential of a panel of tumor markers (CA 125, CA 15-3, and CA 72-4 antigens) in patients with a pelvic mass. *Am J Obstet Gynecol.* 2002. 187:385-392.
- Schwegler EE, Cazares L, Steel LF, Adam BL, Johnson DA, Semmes OJ, Block TM, Marrero JA, Drake RR. SELDI-TOF MS profiling of serum for detection of the progression of chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2005. 41:634-642.
- Schweickert A, Campione M, Steinbeisser H, Blum M. Pitx2 isoforms: involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry. *Mech Dev.* 2000. 90: 41-51.
- Sharma P, Kumar B, Singhal N, Katoch VM, Venkatesan K, Chauhan DS, Bisht D. Streptomycin induced protein expression analysis in *Mycobacterium tuberculosis* by two-dimensional gel electrophoresis & mass spectrometry. *Indian J Med Res.* 2010. 132:400-408.
- Shaw MM, Riederer BM. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 2003. 3:1408-1417.

- Shaw, AJ. Genetic variation for tolerance to copper and zinc within and among populations of the moss *Funaria hygrometrica*. *New Phytol.* 1988. 109:211-222.
- Sheehan KM, Calvert VS, Kay EW, Lu Y, Fishman D, Espina V, Aquino J, Speer R, Araujo R, Mills GB, Liotta LA, Petricoin EF 3rd, Wulfschlegel JD. Use of reverse phase protein microarrays and reference standard development for molecular network analysis of metastatic ovarian carcinoma. *Mol Cell Proteomics.* 2005. 4:346-355.
- Sheta EA, Appel SH, Goldknopf IL. 2D gel blood serum biomarkers reveal differential clinical proteomics of the neurodegenerative diseases. *Expert Rev Proteomics.* 2006. 3:45-62.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996. 68: 850-858
- Shohet RV, Garcia JA. Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia. *J Mol Med (Berl).* 2007. 85:1309-1315.
- Sidransky D, Irizarry R, Califano JA, Li X, Ren H, Benoit N, Mao L. Serum protein MALDI profiling to distinguish upper aerodigestive tract cancer patients from control subjects. *J Natl Cancer Inst.* 2003. 95:1711-1717.
- Sikora AE, Zielke RA, Lawrence DA, Andrews PC, Sandkvist M. Proteomic analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretome reveals new proteins, including three related serine proteases. *J Biol Chem.* 2011. 286:16555-16566.
- Smith CD, Carney JM, Tatsumo T, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR. Protein oxidation in aging brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1992. 663:110-119.
- Smith RA, Cokkinides V, Eyre HJ; American Cancer Society. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2004. 54:41-52.
- Spertini F, Tissot JD, Dufour N, Francillon C, Frei PC. Role of two-dimensional electrophoretic analysis in the diagnosis and characterization of IgD monoclonal gammopathy. *Allergy.* 1995. 50:664-670.
- Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* 2005. 85:1093-1129.

- Stastny J, Fosslie E, Robertson AL Jr. Human aortic intima protein composition during initial stages of atherogenesis. *Atherosclerosis*. 1986. 60:131-139.
- Steel LF, Shumpert D, Trotter M, Seeholzer SH, Evans AA, London WT, Dwek R, Block TM. A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics*. 2003. 3:601-609.
- Steel LF, Trotter MG, Nakajima PB, Mattu TS, Gonye G, Block T. Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. *Mol Cell Proteomics*. 2003. 2:262-270.
- Steely HT Jr, Clark AF. The use of proteomics in ophthalmic research. *Pharmacogenomics*. 2000. 1:267-280.
- Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med*. 2001. 7:493-496.
- Strohman R. Epigenesis: the missing beat in biotechnology? *Biotechnology (N Y)*. 1994. 12:156-164.
- Sun W1, Li F, Wu S, Wang X, Zheng D, Wang J, Gao Y. Human urine proteome analysis by three separation approaches. *Proteomics*. 2005. 5:4994-5001.
- Sung HJ, Ryang YS, Jang SW, Lee CW, Han KH, Ko J. Proteomic analysis of differential protein expression in atherosclerosis. *Biomarkers*. 2006. 11:279-290.
- Tabarés G, Jung K, Reiche J, Stephan C, Lein M, Peracaula R, de Llorens R, Hoesel W. Free PSA forms in prostatic tissue and sera of prostate cancer patients: analysis by 2-DE and western blotting of immunopurified samples. *Clin Biochem*. 2007. 40:343-350.
- Tabibiazar R, Rockson SG. Angiogenesis and the ischaemic heart. *Eur Heart J*. 2001. 22:903-918.
- Tammen H, Schulte I, Hess R, Menzel C, Kellmann M, Mohring T, Schulz-Knappe P. Peptidomic analysis of human blood specimens: comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display. *Proteomics*. 2005. 5:3414-3422.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. Detection of high mass molecules by laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Proc. 2nd Japan-China. Joint symp. Mass Spectrom*. 1987. 185-188.

- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988. 2, 151-153.
- Tang HY, Ali-Khan N, Echan LA, Levenkova N, Rux JJ, Speicher DW. A novel four-dimensional strategy combining protein and peptide separation methods enables detection of low-abundance proteins in human plasma and serum proteomes. *Proteomics.* 2005. 5:3329-3342.
- Tang HY, Speicher DW. Complex proteome prefractionation using microscale solution isoelectrofocusing. *Expert Rev Proteomics.* 2005. 2:295-306.
- Tang N, Tornatore P, Weinberger SR. Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrom Rev.* 2004. 23:34-44.
- Tessari A, Pietrobon M, Notte A, Cifelli G, Gage PJ, Schneider MD, Lembo G, Campione M. Myocardial Pitx2 differentially regulates the left atrial identity and ventricular asymmetric remodeling programs. *Circ Res.* 2008. 102:813-822.
- Thadikkar L, Siegenthaler MA, Crettaz D, Queloz PA, Schneider P, Tissot JD. Recent advances in blood-related proteomics. *Proteomics.* 2005. 5:3019-3034.
- Theodorescu D, Wittke S, Ross MM, Walden M, Conaway M, Just I, Mischak H, Frierson HF. Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *Lancet Oncol.* 2006. 7:230-240.
- Thiellement H, Zivy M, Damerval C, Méchin V. *Plant Proteomics.* 2007. 1^o Ed. Humana Press.
- Thompson S, Dargan E, Turner GA. Increased fucosylation and other carbohydrate changes in haptoglobin in ovarian cancer. *Cancer Lett.* 1992. 66:43-48.
- Thongboonkerd V, Klein JB, Jevans AW, McLeish KR. Urinary proteomics and biomarker discovery for glomerular diseases. *Contrib Nephrol.* 2004. 141:292-307.
- Thongboonkerd V, Malasit P. Renal and urinary proteomics: current applications and challenges. *Proteomics.* 2005. 5:1033-1042.
- Thongboonkerd V. Proteomic analysis of renal diseases: unraveling the pathophysiology and biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics.* 2005. 2:349-366.

- Thulasiraman V, Lin S, Gheorghiu L, Lathrop J, Lomas L, Hammond D, Boschetti E. Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. *Electrophoresis*. 2005. 26:3561-3571.
- Tissot JD, Helg C, Chapuis B, Zubler RH, Jeannet M, Hochstrasser DF, Hohlfield P, Schneider P. Clonal imbalances of serum immunoglobulins after allogeneic bone marrow transplantation: an analysis by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Bone Marrow Transplant*. 1992. 10:347-353.
- Tissot JD, Hochstrasser DF, Spertini F, Schifferli JA, Schneider P. Pattern variations of polyclonal and monoclonal immunoglobulins of different isotypes analyzed by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 1993. 14:227-234.
- Tissot JD, Hochstrasser DF. Analysis of plasma/serum immunoglobulins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Immunol Newsl*. 1993. 13:97-101.
- Tissot JD, Hohlfield P, Forestier F, Tolsa JF, Hochstrasser DF, Calame A, Plouvier E, Bossart H, Schneider P. Plasma/serum protein patterns in human fetuses and infants: a study by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl Theor Electrophor*. 1993. 3:183-190.
- Tissot JD, Hohlfield P, Hochstrasser DF, Tolsa JF, Calme A, Schneider P. Clonal imbalances of plasma/serum immunoglobulin production in infants. *Electrophoresis*. 1993. 14:245-247.
- Tissot JD, Invernizzi F, Schifferli JA, Spertini F, Schneider P. Two-dimensional electrophoretic analysis of cryoproteins. A report of 335 samples. *Electrophoresis*. 1999. 20:606-613.
- Tissot JD, Schneider P, Hohlfield P, Spertini F, Hochstrasser DF, Duchosal MA. Two-dimensional electrophoresis as an aid in the analysis of the clonality of immunoglobulins. *Electrophoresis*. 1993. 14:1366-1371.
- Tissot JD, Spertini F. Analysis of immunoglobulins by two-dimensional gel electrophoresis. *J Chromatogr. A*. 1995. 698:225-250.
- Tissot JD, Vu DH, Aubert V, Schneider P, Vuadens F, Crettaz D, Duchosal MA. The immunoglobulinopathies: from physiopathology to diagnosis. *Proteomics*. 2002. 2:813-824.

- Tomosugi N, Kitagawa K, Takahashi N, Sugai S, Ishikawa I. Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjögren's syndrome. *J Proteome Res.* 2005. 4:820-825.
- Tracy RP, Currie RM, Kyle RA, Young DS. Two-dimensional gel electrophoresis of serum specimens from patients with monoclonal gammopathies. *Clin Chem.* 1982. 28:900-907.
- Tracy RP, Kyle RA, Young DS. Two-dimensional gel electrophoresis as an aid in the analysis of monoclonal gammopathies. *Hum Pathol.* 1984. 15:122-129.
- Trinkler N, Guichard N, Labonne M, Plasseraud L, Paillard C, Marin F. Variability of shell repair in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affected by the brown ring disease: a microstructural and biochemical study. *J Invert Pathol.* 2011. 106:407-417.
- Trinkler N, Sinquin G, Querne J, Paillard C. Resistance of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: a study of selected stocks showing a recovery process by shell repair. *J Invertebr Pathol.* 2010. 104:8-16
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res.* 2009. 81:449-456.
- Turck CW, Maccarrone G, Sayan-Ayata E, Jacob AM, Ditzen C, Kronsbein H, Birg I, Doertbudak CC, Haegler K, Lebar M, Teplytska L, Kolb N, Uwaje N, Zollinger R. The quest for brain disorder biomarkers. *J Med Invest.* 2005. 52 Supl:231-235.
- Unlu M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis.* 1997. 18:2071-2077.
- Van den Bergh G, Arckens L. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Curr Opin Biotechnol.* 2004. 15:38-43.
- Van Eyk JE. Proteomics: unraveling the complexity of heart disease and striving to change cardiology. *Curr Opin Mol Ther.* 2001. 3:546-553
- van Haaften-Day C, Shen Y, Xu F, Yu Y, Berchuck A, Havrilesky LJ, de Bruijn HW, van der Zee AG, Bast RC Jr, Hacker NF. OVX1, macrophage-colony stimulating factor, and CA-125-II as tumor markers for epithelial ovarian carcinoma: a critical appraisal. *Cancer.* 2001. 92:2837-2844.

- VanBogelen RA, Kelley PM, Neidhardt FC. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidative stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1987. 169:26-32.
- Veenstra TD, Conrads TP, Hood BL, Avellino AM, Ellenbogen RG, Morrison RS. Biomarkers: mining the biofluid proteome. *Mol Cell Proteomics*. 2005. 4:409-418.
- Vercauteren FG, Arckens L, Quirion R. Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. *Amino Acids*. 2007. 33:405-414.
- Vlahou A, Laronga C, Wilson L, Gregory B, Fournier K, McGaughey D, Perry RR, Wright GL Jr, Semmes OJ. A novel approach toward development of a rapid blood test for breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2003. 4:203-209.
- Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S, Patel K, Kondylis FI, Gong L, Nasim S, Wright Jr GL Jr. Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine. *Am J Pathol*. 2001. 158:1491-1502.
- Volm M, Koomägi R, Efferth T, Mattern J. Protein expression profiles of non-small cell lung carcinomas: correlation with histological subtype. *Anticancer Res*. 2002. 22:2321-2324.
- von Krüger WM, Lery LM, Soares MR, de Neves-Manta FS, Batista e Silva CM, Neves- Ferreira AG, Perales J, Bisch PM. The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and *phoB* mutant under proteomic analysis: disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. *Proteomics*. 2006. 6:1495-1511.
- Walters DA, Washburn MP, Yates JR. 3rd. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem*. 2001. 73:5683-5690.
- Wang J, Klysik E, Sood S, Johnson RL, Wehrens XH, Martin JF. *Pitx2* prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. 107:9753-9758.
- Wang X, Kuang T, He Y. Conservation between higher plants and the moss *Physcomitrella patens* in response to the phytohormone abscisic acid: a proteomics analysis. *Plant Biology*. 2010. 10:192.

- Wang, X, Yang, P, Gao, Q, Liu, X, Kuang T, Shen S, He, Y. Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in *Physcomitrella patens*. *Planta*. 2008. 228:167-177.
- Wang X, Yang P, Liu Z, Liu W, Hu Y, Chen H, Kuang T, Pei Z, Shen S, He Y. Exploring the mechanism of *Physcomitrella patens* desiccation tolerance through a proteomic strategy. *Plant Physiology*. 2009b. 149:1739-1750.
- Wang X, Yang P, Zhang X, Xu Y., Kuang T, Shen S, He Y. Proteomic analysis of the cold stress response in the moss, *Physcomitrella patens*. *Proteomics*. 2009a. 9:4529-4538.
- Washburn MP, Ulaszek R, Deciu C, Schieltz DM, Yates JR 3rd. Analysis of quantitative proteomic data generated via multidimensional protein identification technology. *Anal Chem*. 2002. 74:1650-1657.
- Weekes J, Morrison K, Mullen A, Wait R, Barton P, Dunn MJ. Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy. *Proteomics*. 2003. 3:208-216.
- Weekes J, Wheeler CH, Yan JX, Weil J, Eschenhagen T, Scholtysik G, Dunn MJ. Bovine dilated cardiomyopathy: proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis*. 1999. 20:898-906.
- Westermeier R, Naven, T. *Proteomics in practice. A laboratory manual of proteome analysis*. 2002. 1st Ed. Wiley-Science.
- Wetmore BA, Merrick BA. Toxicoproteomics: proteomics applied to toxicology and pathology. *Toxicol Pathol*. 2004. 32:619-642.
- Williams KL. Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology. *Electrophoresis*. 1999. 20:678-688.
- Wilm M, Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem*. 1996. 68:1-8.
- Wolters DA, Washburn MP, Yates JR 3rd. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem*. 2001. 73:5683-5690.
- Woolas RP, Xu FJ, Jacobs IJ, Yu YH, Daly L, Berchuck A, Soper JT, Clarke-Pearson DL, Oram DH, Bast RC Jr. Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1993. 85:1748-1751.
- Wu CC, MacCoss MJ, Howell KE, Yates JR 3rd . A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat Biotechnol*. 2003. 21:532-538.

- Wu CC, Yates JR 3rd. The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat Biotechnol.* 2003. 21:262-267.
- Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, Massion PP, Larsen PH, White BC, Roberts JR, Edgerton M, Gonzalez A, Nadaf S, Moore JH, Caprioli RM, Carbone DP. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet.* 2003. 362:433-439.
- Yates JR 3rd. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J Mass Spectrom.* 1998. 33:1-19.
- Yates JR. 3rd. Mass spectrometry. From genomics to proteomics. *Trends Genet.* 2000. 16:5-8.
- Yates JR. Protein structure analysis by mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 1996. 271:351-77.
- Ye B, Cramer DW, Skates SJ, Gygi SP, Pratomo V, Fu L, Horick NK, Licklider LJ, Schorge JO, Berkowitz RS, Mok SC. Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin Cancer Res.* 2003. 9:2904-2911.
- Yokoyama Y, Terai S, Ishikawa T, Aoyama K, Urata Y, Marumoto Y, Nishina H, Nakamura K, Okita K, Sakaida I. Proteomic analysis of serum marker proteins in recipient mice with liver cirrhosis after bone marrow cell transplantation. *Proteomics.* 2006. 6:2564-2570.
- You SA1, Archacki SR, Angheloiu G, Moravec CS, Rao S, Kinter M, Topol EJ, Wang Q. Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker: evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis. *Physiol Genomics.* 2003. 13:25-30.
- Yuan X, Desiderio DM. Proteomics analysis of prefractionated human lumbar cerebrospinal fluid. *Proteomics.* 2005. 5:541-550.
- Zechmeister HG, Grodzinska K, Szarek-Lukaszewska G. Bryophytes. *Bioindicators and Biomonitors, Principles, Concepts and Applications.* 2003. Elsevier, Netherlands, Chapter 10, pp 329-376.
- Zhang H, Kong B, Qu X, Jia L, Deng B, Yang Q. Biomarker discovery for ovarian cancer using SELDI-TOF-MS. *Gynecol Oncol.* 2006. 102:61-66.

- Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ, Rosenzweig JM, Cameron B, Wang YY, Meng XY, Berchuck A, Van Haaften-Day C, Hacker NF, de Bruijn HW, van der Zee AG, Jacobs IJ, Fung ET, Chan DW. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2004. 64:5882-58890.
- Zhou S, Bailey MJ, Dunn MJ, Preedy VR, Emery PW. A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure. *Proteomics.* 2005. 5:2739-2747.
- Zhu H, Klemic JF, Chang S, Bertone P, Casamayor A, Klemic KG, Smith D, Gerstein M, Reed MA, Snyder M. Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet.* 2000. 26:283-289.
- Zimmermann-Ivol CG, Burkhard PR, Le Floch-Rohr J, Allard L, Hochstrasser DF, Sanchez JC. Fatty acid binding protein as a serum marker for the early diagnosis of stroke: a pilot study. *Mol Cell Proteomics.* 2004. 3:66-72.
- Zolotarjova N, Martosella J, Nicol G, Bailey J, Boyes BE, Barrett WC. Differences among techniques for high-abundant protein depletion. *Proteomics.* 2005. 5:3304-3313.
- Zuidervaart W, Hensbergen PJ, Wong MC, Deelder AM, Tensen CP, Jager MJ, Gruis NA. Proteomic analysis of uveal melanoma reveals novel potential markers involved in tumor progression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006. 47:786-93.
- Zuo X, Speicher DW. Comprehensive analysis of complex proteomes using microscale solution isoelectrofocusing prior to narrow pH range two-dimensional electrophoresis. *Proteomics.* 2002. 2:58-68.